

# **Cyclosporin A som hemmer av CYP3A4 og CYP3A5**

**Ingrid Kristine Ohm**



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2010

# **Cyclosporin A som hemmer av CYP3A4 og CYP3A5**

Ingrid Kristine Ohm



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2010

Veiledere

Hege Christensen

Rune Amundsen

## Forord

*Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, under veiledning av professor Hege Christensen. Arbeidet ble påbegynt august 2009 og avsluttet mai 2010.*

*Først og fremst vil jeg takke Hege Christensen for super veiledning og oppfølging gjennom arbeidet med masteroppgaven. Du er en glimrende veileder med et svært inspirerende og smittende engasjement og humør. Livet ser unektelig mye lysere ut etter et besøk på ditt kontor!*

*Jeg vil også takke Rune Amundsen for veiledning, og faglige og praktiske innspill gjennom det siste året. Takk for at du med godt humør har tatt deg tid til å hjelpe, på tross av å være i sluttfasen av doktorgradsarbeidet.*

*I tillegg vil jeg takke Siri Johannesen for all god hjelp med laboratoriearbeid, og som alltid har hatt en praktisk løsning på problemer som har dukket opp i tide og utide. Du er en guru på laben!*

*Jeg retter en stor takk til Bjørn Winther for uvurderlig hjelp med LC-MS når den slo seg vrang (og det var forholdsvis ofte). Tusen takk for at du tok deg tid til å hjelpe med små og store problemer, og ikke minst for at du ofret en hel fredagskveld for å optimalisere kromatogrammene mine. Du er en kromatografisk superhelt!*

*Jeg vil i tillegg rette en stor takk til mine medstudenter Solveig, Nina, Robert, Kaja, Kjerstin og Torkild som jeg har delt kontor med dette siste året. Tusen takk for alle faglige og ikke-faglige samtaler, støtte og oppmuntring disse månedene. Dere har bidratt stort til at dette har vært det desidert beste av fem flotte år på FI.*

*Sist, men ikke minst, vil jeg takke familie og venner for villig å låne bort et øre eller to til en til tider frustrert student med LC-MS-problemer. Tusen takk for all støtte og oppmuntring gjennom studiet og spesielt i denne siste innspurten.*

*Blindern, Oslo 14.mai 2010*

*Ingrid Kristine Ohm*

# Innholdsfortegnelse

<b>FORKORTELSESLISTE .....</b>	<b>6</b>
<b>SAMMENDRAG.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>10</b>
1.1 METABOLISME .....	10
1.2 CYTOKROM P450 .....	10
1.2.1 CYP3A.....	13
1.3 ENZYMKINETIKK .....	17
1.3.1 Michaelis-Menten kinetikk .....	17
1.3.2 Atypisk kinetikk.....	20
1.3.3 Enzymhemning .....	22
1.4 IN VITRO-MODELLER .....	23
1.4.1 Humane levermikrosomer .....	23
1.4.2 Rekombinant in vitro-modell.....	24
1.4.3 Hepatocytter.....	25
1.4.4 Leverstykker .....	25
1.5 MIDAZOLAM .....	26
1.6 CYCLOSPORIN A.....	27
1.7 BAKGRUNN FOR OPPGAVEN.....	30
1.7.1 Hensikt .....	31
<b>2. MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>33</b>
2.1 MATERIALER.....	33
2.1.1 Utstyr.....	33

2.1.2	Kjemikalier.....	34
2.2	LØSNINGER .....	34
2.3	METODER.....	35
2.3.1	Løselighetsforsøk .....	35
2.3.2	Forsøk med cyclosporin A som hemmer .....	35
2.3.3	LC-MS analyse.....	39
2.3.4	Beregning av data .....	40
<b>3.</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>41</b>
3.1	LØSELIGHETSFORSØK .....	41
3.1.1	Effekt av DMSO .....	41
3.1.2	Effekt av silikonbehandlede glassrør .....	43
3.2	FORSØK MED CYCLOSPORIN A SOM HEMMER .....	44
3.2.1	Koinkubasjonsforsøk.....	44
3.2.2	Preinkubasjonsforsøk.....	47
3.2.3	Koinkubasjonsforsøk versus preinkubasjonsforsøk.....	50
<b>4.</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>53</b>
4.1	LØSELIGHETSFORSØK .....	53
4.2	FORSØK MED CYCLOSPORIN A SOM HEMMER .....	54
4.2.1	CYP3A4.....	54
4.2.2	CYP3A5.....	56
<b>5.</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>58</b>
	<b>KILDELISTE.....</b>	<b>59</b>

## Forkortelsesliste

[S]	Substratkonsentrasjon
1'-OH MDZ	1'-hydroksymidazolam
4'-OH MDZ	4-hydroksymidazolam
AUC	Areal under kurve
C <sub>8</sub>	Omvendt fase kolonnemateriale
cDNA	Komplementær DNA
CL	Volum blod/plasma som renses for substrat per tidsenhet (clearance)
CL <sub>int</sub>	Clearance intrinsic
CO	Karbonmonoksid
CsA	Cyclosporin A
CYP	Cytokrom P450-enzym
DIA	Diazepam
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
E	Enzym
EDTA	Etylen diaminetetrasyre
ER	Endoplasmatisk Retikulum
ES	Enzym-substratkompleks
G	Gravitasjonskraft
GABA	Gamma-aminosmørsyre
GABA <sub>A</sub> -reseptor	Gamma-aminosmørsyre reseptor A
H <sub>2</sub> O	Vann
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Svovelsyre
HEPES	4(2-hydroksetyl)-1-piperazinetan sulfonsyre
HLM	Humane levermikrosomer
HMG-CoA	3-hydroksey-3-metylglutaryl-koenzym A
IC <sub>50</sub> -verdi	Halv maksimal inhibitorisk konsentrasjon

IL-2	Interleukin 2
K'	Interaksjonsfaktorer
$k_1$	Assosiasjonskonstant for dannelse av ES
$k_{-1}$	Dissosiasjonskonstant for revers dannelse av E+S
$k_2$	Assosiasjonskonstant for dannelse av E+P
$k_{-2}$	Dissosiasjonskonstant for revers dannelse av ES
$K_m$	Michaelis-Menten konstant
LC-MS	Væskekromatografi med massepektrometrisk deteksjon
M1	Metabolitt 1
MDZ	Midazolam
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MIC	Metabolsk intermediatkompleks
n	Grad av kooperativitet
N <sub>2</sub> -gass	Nitrogengass
NADPH	Nikotinamid adenine dinukleotidfosfat
NaOH	Natriumhydroksid
NFAT	Nukleær faktor av aktiverte T-celler
O <sub>2</sub>	Molekylært oksygen
OATP1B1	Organisk aniontransporterende polypeptid 1B1
P-gp	Permeabilitetsglykoprotein
S	Substrat
T-celler	Thymus-celler
Trisma-base	Tris(hydroksymetyl)aminometan
UGT	UDP-glukuronosyltransferaser
V <sub>0</sub>	Initiell reaksjonshastighet
V <sub>max</sub>	Maksimal reaksjonshastighet

## Sammendrag

### Problemstilling

Cyclosporin A (CsA) er en kalsinevrinhemmer som i stor grad brukes av pasienter som har gjennomgått organtransplantasjon. Denne pasientgruppen bruker ofte også flere andre legemidler, som for eksempel statiner (atorvastatin). Et samtidig inntak av CsA og atorvastatin vil imidlertid føre til en kraftig økning i systemisk eksponering av atorvastatin. Mekanismen bak dette antas i hovedsak å være hemning av transportører av atorvastatin, men det har i tillegg vært diskutert om det også kan skyldes en hemning av CYP3A-metabolisme. Hensikten med denne oppgaven var å studere CsAs hemning av CYP3A4 og CYP3A5, og undersøke om hemningen var mekanismebasert.

### Metode

Hemningen av CYP3A4 og CYP3A5 med CsA ble undersøkt *in vitro* i insektmikrosomer, med midazolam (MDZ) som probesubstrat. Det ble først utført koinkubasjonsforsøk og deretter preinkubasjonsforsøk. I koinkubasjonsforsøket ble CsA og MDZ tilsatt samtidig til mikrosomene, mens det i preinkubasjonsforsøkene ble tilsatt CsA til mikrosomene 15 min før tilsats av MDZ. Prøvene ble analysert på LC-MS, og prosentvis gjenværende enzymaktivitet ble beregnet på bakgrunn av toppene for metabolittene 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ, og den interne standarden, diazepam (DIA), i kromatogrammene. Dette ble videre brukt i estimeringen av IC<sub>50</sub>-verdier i GraphPad Prism.

### Resultater

Koinkubasjonsforsøkene viste at CsA hadde en hemmende effekt på CYP3A4 med en IC<sub>50</sub>-verdi på ca 3 µM for dannelsen av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ. Det ble ikke observert at CsA gav hemning av CYP3A5, verken ved 1'- eller 4-hydroksylering av MDZ. Ved preinkubasjon av CsA og CYP3A4 ble det estimert en IC<sub>50</sub>-verdi på ca 2,0 µM for dannelsen av 1'-OH MDZ, mens IC<sub>50</sub>-verdien for 4-OH MDZ var ca 3 µM. Det ble heller ikke observert at CsA gav hemning av CYP3A5 ved preinkubasjon.



**Konklusjon**

CsA hemmet CYP3A4-mediert metabolisme av MDZ, gjennom redusert dannelse av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ. Ettersom det var liten forskjell i de estimerte IC<sub>50</sub>-verdiene ved ko- og preinkubasjon, er det lite trolig at denne hemningen er mekanismebasert. Det bør imidlertid utføres flere forsøk for å få dette verifisert.

Til forskjell fra CYP3A4, ble ikke dannelsen av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ via CYP3A5 hemmet nevneverdig av CsA, verken ved koinkuberingsforsøkene eller preinkuberingsforsøkene.

# 1. Innledning

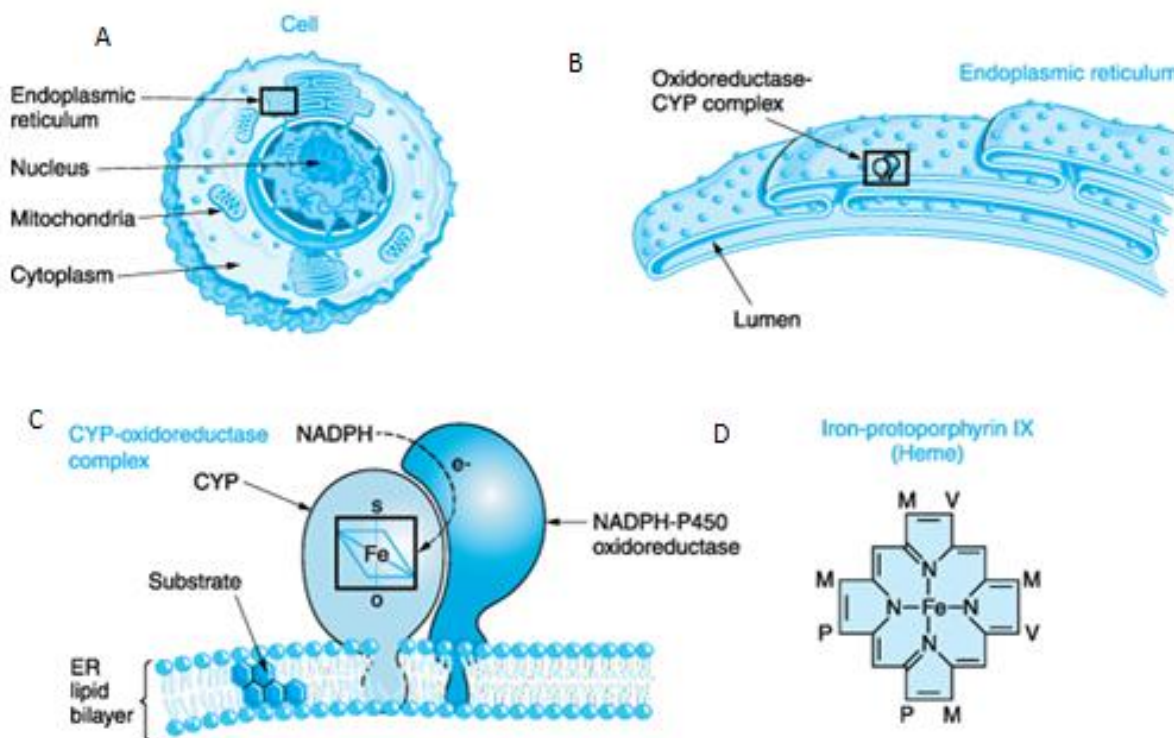
## 1.1 Metabolisme

Metabolisme består av en rekke essensielle kjemiske reaksjoner der næringsstoffene i mat blir omdannet til energi som kroppen behøver for å kunne fungere. En slik omdannelse er imidlertid ikke kun begrenset til metabolisme av maten som inntas, men inkluderer også andre eksogene stoffer kroppen utsettes for, så vel som endogene stoffer naturlig til stede i kroppen. Metabolismen er en form for beskyttelse mot stoffer som er fremmede for kroppen (xenobiotika) og som derfor, potensielt, kan være farlige. Mye av det vi mennesker kommer i kontakt med i dagliglivet er xenobiotika av ulike slag, det være seg mat, drikke, forurensninger, kosmetikk, tilsetningsstoffer, og sist men ikke minst legemidler. For å unngå at disse stoffene utøver en toksisk effekt på kroppen, blir de omdannet til derivater med mer hydrofile egenskaper, noe som gjør det lettere å skille dem ut i galle eller urin. Metabolismen kan deles inn i to faser; fase 1 og fase 2, avhengig av hvilke reaksjoner som foregår. I fase 1 drives metabolismen av enzymer som katalyserer reaksjoner av typen oksidasjon, reduksjon og andre hydrolytiske reaksjoner, og resultatet blir nye funksjonelle grupper som festes til xenobiotikamolekylene [1]. En slik reaksjon vil ikke nødvendigvis endre stoffets løselighet i vann, men påvirker i stor grad de biologiske egenskapene stoffet innehar [1], og vil i tillegg fungere som et angrepspunkt for fase 2 metabolismen [2]. Fase 2 metabolisme drives også av katalytiske enzymer. I denne fasen omdannes ofte fase 1 produkter til metabolitter med høyere molekylvekt, via konjugeringsreaksjoner [1]. Metabolittene blir som følge av dette mer løselig i vann og vil, i all praktisk betydning, være farmakologisk inaktive [2].

## 1.2 Cytokrom P450

Fase 1 metabolisme drives hovedsakelig av biotransformerende cytokrom P450-enzymmer (CYP-enzymmer). De aller fleste vev uttrykker CYP-enzymmer, men den

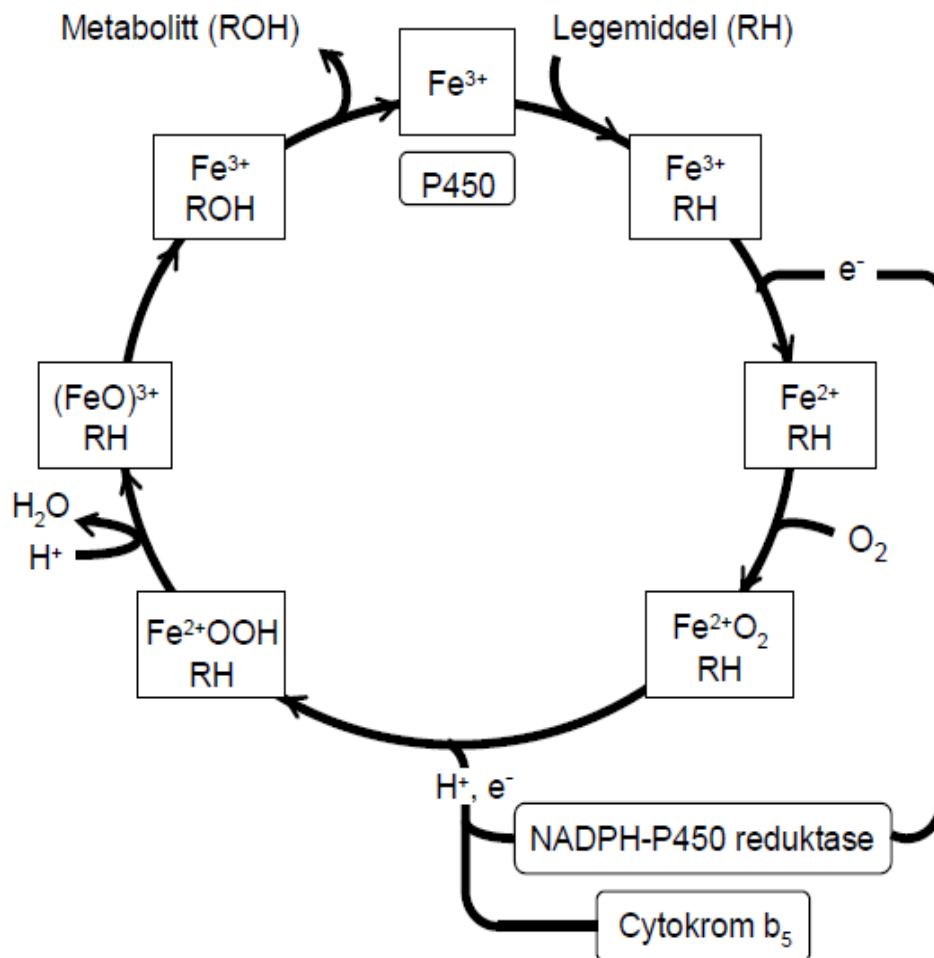
høyeste konsentrasjonen av disse enzymene finnes i endoplasmatisk retikulum i hepatocytene [1, 3], og omtales derfor ofte som mikrosomale enzymer (Figur 1) [2].



**Figur 1: Cytokrom P450-enzymers lokalisering i celler. A:** Oppbygning av eukaryot celle. **B:** Oppbygning av endoplasmatisk retikulum. **C:** CYP-enzym og NADPH-cytokrom P450 oksidoreduktases lokalisering i ER. **D:** Hemets oppbygning [1].

For at xenobiotika kan metaboliseres av P450-enzym, må stoffene passere cellemembranen. Passering av cellemembranen vil være avhengig av stoffenes hydrofobisitet, da upolare stoffer lettere passerer den hydrofobe cellemembranen enn mer polare stoffer. Polare stoffer vil derfor i større grad utskilles uforandret i urin enn upolare stoffer [2]. I tillegg til å delta i nedbrytningen av ulike xenobiotika, er CYP-enzymene involvert i biosyntesen/katabolismen av en rekke endogene forbindelser som steroidhormoner, gallesyrer, fettløselige vitaminer, fettsyrer og eikosanoider, noe som understreker den store katalytiske bredden disse enzymene utviser [3].

CYP-enzymene er en superfamilie av hemproteiner som katalyserer omdannelsen av xenobiotika, så vel som endogene stoffer, i monooksygeneringsreaksjoner [1, 3]. I denne reaksjonen bruker P450-enzymene molekylært oksygen ( $O_2$ ), der det ene



*Figur 2: Katalytisk syklus for CYP-enzym [2].*

oksygenatomet inkorporeres i substrat, mens det andre reduseres til vann. Hemjernet er vanligvis treverdig ( $Fe^{3+}$ ), men reduseres i oksygeneringsreaksjonen til toverdig jern ( $Fe^{2+}$ ). Dette muliggjør binding mellom CYP-enzymet og ligander som  $O_2$  og CO [3]. Komplekset mellom CYP og CO har maksimal absorpsjon av lys ved 450 nm; og har gitt opphav til navnet "cytokrom P450" [3]. Under katalysen bindes CYP-enzym direkte til substrat og molekylært oksygen. For at enzymene skal kunne fungere optimalt må det tilføres elektroner, som doneres av NADPH-cytokrom P450 oksidoreduktase (NADPH-P450 reduktase) og cytokrom  $b_5$  [3]. Metabolismen av xenobiotika foregår i en syklus, der første del involverer aktivering av oksygen, mens

siste del involverer substrataktivering (Figur 2) [3]. Etter binding av substrat (RH) til P450-enzymene, reduseres hemjernet fra  $\text{Fe}^{3+}$  til  $\text{Fe}^{2+}$  ved tilsats av ett enkelt elektron ( $e^-$ ) fra NADPH-P450 reduktase. Oksygen bindes så til CYP-enzymet i dens toverdige tilstand, og det dannes et  $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2$ -kompleks som videre omdannes til  $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}$ -kompleks etter tilførsel av et proton ( $\text{H}^+$ ) og et nytt elektron fra NADPH-cytokrom P450 reduktase eller cytokrom  $b_5$ . Introduksjon av et nytt proton spalter  $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}$ -komplekset til  $\text{H}_2\text{O}$  og et  $(\text{FeO})^{3+}$ -kompleks, som videre overfører oksygenatomet til substratet ( $\text{RH} \rightarrow \text{ROH}$ ). Frigjøringen av oksidert substrat fører cytokrom P450-enzymene tilbake i opprinnelig tilstand;  $\text{Fe}^{3+}$ , og den katalytiske syklusen kan starte på ny [3].

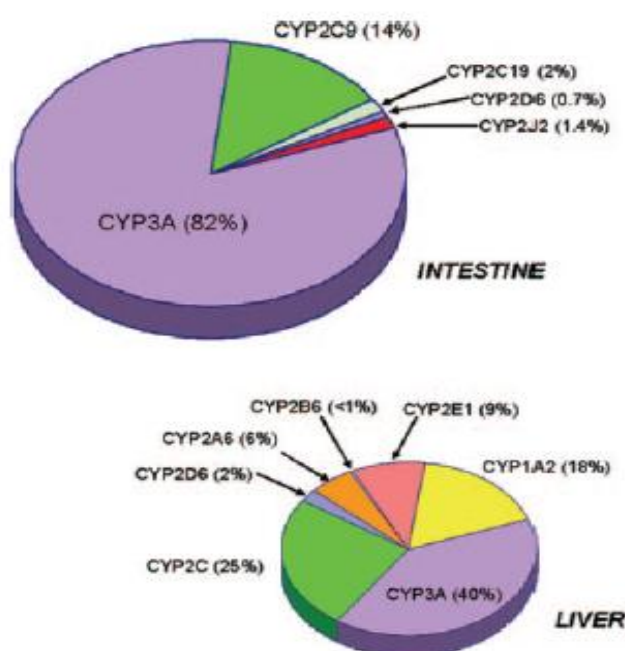
Som nevnt tidligere er cytokrom P450 en stor gruppe enzymer med beslektede, men likevel forskjellige enzymer, som skiller seg fra hverandre med hensyn på aminosyresekvens, regulering av hemmere og induktorer, og spesifisiteten til reaksjonene de katalyserer [2]. Navngivelsen til enzymene starter alltid med CYP; som en forkortelse av cytokrom P450 [2]. Man har per april 2003 beskrevet 57 ulike gener som koder for humane CYP-enzymene [4]. CYP-enzymene med mindre enn 40 % aminosyresekvenslikhet inndeles i ulike genfamilier [3], som da angis som et arabisk tall etter "CYP"; eks 1, 2, 3, og så videre [1]. CYP-enzymene som er 40-55 % identiske settes i ulike underfamilier [3]. Dette angis i navnet som en latinsk bokstav; som for eksempel 1A, 2B, 2C, 3A, og så videre [1]. Til slutt settes enzymene som er mer enn 55 % identiske, i samme underfamilie [3], og CYP-isoenzymet oppgis da ved enda et arabisk tall etterfølgende den latinske bokstaven [1]. Et eksempel på dette er CYP-enzymet CYP3A4, der enzymet er et cytokrom P450-enzym av familien 3, innen underfamilien A og med gennummer 4 [1].

### 1.2.1 CYP3A

CYP3A anses å være den kvantitativt viktigste underfamilien innen cytokrom P450-familien [5], både med tanke på utbredelse i tarm og lever [6, 7], men også med hensyn på graden av metabolisme [1, 8]. Det er funnet at CYP3A-familien utgjør ca 30-40 % av totalt P450-innhold i lever (Figur 3) [6, 7], og over 80 % av totalt P450-

innhold i tarm [7]. Mye tyder på at tarmen er viktig i presystemisk, CYP3A-mediert metabolisme ettersom mengden CYP3A av totalinnholdet av CYP-enzymene i tarm er dobbelt så stort som det samme forholdet i lever [7]. Dette, sett i sammenheng med viten om at CYP3A-familien katalyserer metabolismen av over 50 % av legemidlene som er i klinisk bruk i dag [1], indikerer at om lag halvparten av legemidlene som administreres oralt får redusert biotilgjengelighet som følge av førstepassasjemetabolisme.

Som nevnt tidligere deles underfamilier som CYP3A-familien videre inn i



**Figur 3: Oversikt over CYP3A bidrag til totalt CYP-innhold i tarm og lever.**  
I tarm er bidraget av CYP3A over 80 %, mens det i lever er ca 40 % [7].

isoenzymer. I CYP3A-familien er det identifisert fire ulike enzymer: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 [3], og CYP3A43 [8]. Av disse regnes CYP3A4 som det enzymet av størst betydning, særlig med hensyn på uttrykksnivåene i tarm og lever [6, 7, 9], mens CYP3A43 anses som det minst viktige ettersom det uttrykkes i svært lav grad i blant annet lever [8, 9]. Det har lenge vært antatt at CYP3A7 kun fantes i lever hos embryo og foster [10], og at nivåene av dette enzymet ble redusert kort tid etter fødselen [11]. Nå er det imidlertid også funnet CYP3A7

uttrykt i voksne, men ettersom nivåene er mye lavere enn for CYP3A4, er det lite trolig at dette bidrar stort til den totale CYP3A-aktiviteten i leveren [12].

## CYP3A4

CYP3A4 er, som nevnt tidligere, regnet for å være det viktigste av enzymene i CYP3A-familien, da man har funnet at CYP3A4-transkripter står for 95 % av alle CYP3A-transkripter i en gjennomsnittlig lever [9]. Det er til nå funnet 40 CYP3A4

alleler [13], og av alle allelene som er identifisert og karakterisert har ingen vist seg å føre til endringer av den katalytiske aktiviteten til CYP3A4 *in vivo* [14]. Man regner dermed ikke CYP3A4 som et polymorft enzym. Det kan likevel virke som om genetiske faktorer er av stor betydning i interindividuell variabilitet i uttrykk og aktivitet av CYP3A4 da det er antydning at ca 90 % av denne variasjonen er genetisk bestemt [15, 16], uten at de vesentlige genetiske faktorene er avdekket [15]. Inntaket av eksogene faktorer, som visse typer legemidler og matvarer, kan gjennom hemning og induksjon endre det fenotypiske uttrykket av CYP3A4, og slik påvirke enzymets aktivitet [15]. Det er velkjent at noen typer matvarer som for eksempel grapefruktjuice vil utøve kraftig hemmende effekt på CYP3A4 [17]. Dette kan gi utslag på pasienters helse der pasienter i tillegg inntar legemidler som er substrater av CYP3A4 [17]. I slike tilfeller vil hemningen av CYP3A4 både i tarm og lever kunne føre til økt AUC [17] for legemiddelsubstratet som følge av redusert clearance (CL), ved hemning av enzymet i hepatocytene, og/eller økt absorpsjon, ved hemning av enzymene i enterocytene [3, 18].

For at enzymene skal utøve en katalytisk effekt på substratene må disse bindes i det aktive setet på enzymene [19]. I CYP3A4 ligger det aktive setet i et hulrom i proteinstrukturen, rett over hemoverflaten [20]. Ettersom hemjernet danner basisen for det aktive setet, må substratene bindes nær dette for å bli oksidert [20]. Det aktive setet/hulrommet i CYP3A4s struktur er relativt stort, noe som bidrar til den omfattende kapasiteten CYP3A4 har til å oksidere stoffer av svært ulik karakter og størrelse [20]. CYP3A4 kan for eksempel oksidere svært små molekyler som etanol og legemidler av typen nifedipin og midazolam, i tillegg til å kunne oksidere store molekyler som cyclosporin A og erytromycin [20]. Ved binding av små molekyler, som nifedipin og midazolam, vil det fremdeles være mye tomrom i det aktive setet, noe som kan tillate at flere molekyler bindes samtidig [20, 21], enten som flere molekyler av samme substrat; homotropi, eller flere molekyler av ulike substrater; heterotropi [21].

## CYP3A5

CYP3A5 har 85 % sekvenslikhet med CYP3A4 [22], og enzymene utviser i tillegg til dels overlappende substratspesifisitet [23]. Denne overlappende substratspesifisiteten betyr at CYP3A4 og CYP3A5 katalyserer omdannelsen av mange av de samme stoffene, skjønt CYP3A5 ofte har lavere metabolsk aktivitet sammenliknet med CYP3A4 [23]. Et eksempel på dette er omdannelsen av midazolam (MDZ) til 1'-hydroksymidazolam (1'-OH MDZ) og 4-hydroksymidazolam (4-OH MDZ), der CYP3A5 gir høyere 1'-OH MDZ/4-OH MDZ-ratio enn CYP3A4 ved lave konsentrasjoner MDZ [23]. Selv om det generelt er akseptert at CYP3A5 har lavere katalytisk aktivitet enn CYP3A4 [5, 22], er det funnet motstridende resultater i ulike forskningsgrupper. Williams *et al.* fant i 2002 at CYP3A5 hadde lik eller til dels redusert aktivitet sammenliknet med CYP3A4 avhengig av substrat [24], mens Patki *et al.* fant at CYP3A5 hadde betydelig lavere intrinsic clearance i forhold til CYP3A4 ved alle substratene som ble testet [5]. Likevel blir CYP3A5 ansett som et enzym av interesse på grunn av sitt polymorfe uttrykk og sin rasedistribusjon [22]. Dette er faktorer som kan være av betydning ved dosering av legemidler som metaboliseres av CYP3A4, ettersom CYP3A4 og CYP3A5 utviser overlappende substratspesifisitet. I tillegg vil disse faktorene kunne påvirke graden av legemiddelinteraksjoner, da CYP3A5 i mindre grad enn CYP3A4 lar seg indusere og/eller hemme [5, 25].

Det er til nå identifisert 26 CYP3A5-alleler [13], der CYP3A5\*1 koder for det funksjonelle enzymet, mens CYP3A5\*3 er assosiert med manglende hepatisk og intestinalt enzym [26]. Betegnelsen \*1 denoteres vanligvis de allelene som koder for den mest alminnelige allelvarianten, som bruker å være det funksjonelle proteinet [26]. I CYP3A5s tilfelle er det riktignok gitt betegnelsen \*1 til det allelet som koder for det funksjonelle enzymet, men dette allelet er imidlertid ikke det vanligste [26]. Det vanligste av CYP3A5-allelene, som man finner hos størsteparten av befolkningen, er CYP3A5\*3 som gir ikke-funksjonelt enzym [26]. Dersom man uttrykker genotype CYP3A5\*1/\*1 (homozygot) eller genotype CYP3A5\*1/\*3 (heterozygot) vil det uttrykkes fenotypisk funksjonelt CYP3A5-enzym, i henholdsvis større eller mindre grad, mens man ikke vil få fenotypisk uttrykk av aktivt enzym ved genotype CYP3A5\*3/\*3 (homozygot) alleler [27]. Årsaken til at det ikke dannes aktivt



CYP3A5 ved *CYP3A5\*3*-alleler er enkelt nukleotidpolymorfismer (SNP) som fører til defekt splicing av *CYP3A5\*3*-transkriptet. Dette gir dannelse av stoppkodon som, ved translasjon av mRNA med det abnormale transkriptet, koder for protein som termineres prematurt, og således ikke kan fungere normalt [27]. Kuehl *et al.* gjorde i 2001 en studie der de blant annet undersøkte etnisk forskjell i uttrykk av allelfrekvenser, og fant at ca 30 % av kaukasiere, japanere og meksikanere, ca 40 % av kinesere, og over 50 % av afrikanske amerikanere, sørøst asiater, stillehavsøyboere og sørvest indianere uttrykker funksjonelt CYP3A5 [27]. Det ble også funnet at dette enzymet utgjorde ca 50 % av det totale CYP3A-innholdet i en tredjedel av kaukasiske leverer og halvparten av afrikansk-amerikanske leverer [27]. I 2003 fant Westlind-Johnsson *et al.* at bidraget av CYP3A5 i individer med minst ett *CYP3A5\*1*-allel utgjorde mellom 13-27 % av totalt CYP3A [15], mens Huang *et al.* fant i 2004 at CYP3A5 stod for ca 27 % av total metabolittdannelse ved omdanning av MDZ [23]. Den samme gruppen postulerer at CYP3A5 vil kunne gi betydelig bidrag til total metabolsk clearance av flere legemidler av ulik grad, avhengig av om individet er homo- eller heterozygot for *CYP3A5\*1* [23].

CYP3A5 finnes flere steder utenfor lever og tarm, blant annet i nyrer, binyrer, prostata [9], bryst [24] og lunger [27], og regnes for å være det viktigste enzymet innen CYP3A-familien som uttrykkes ekstrahepatisk og ekstraintestinalt [24]. Dette kan bety at CYP3A5 her har en fysiologisk betydning, for eksempel gjennom kontroll av endogene substanser som steroidhormoner [24].

## 1.3 Enzymkinetikk

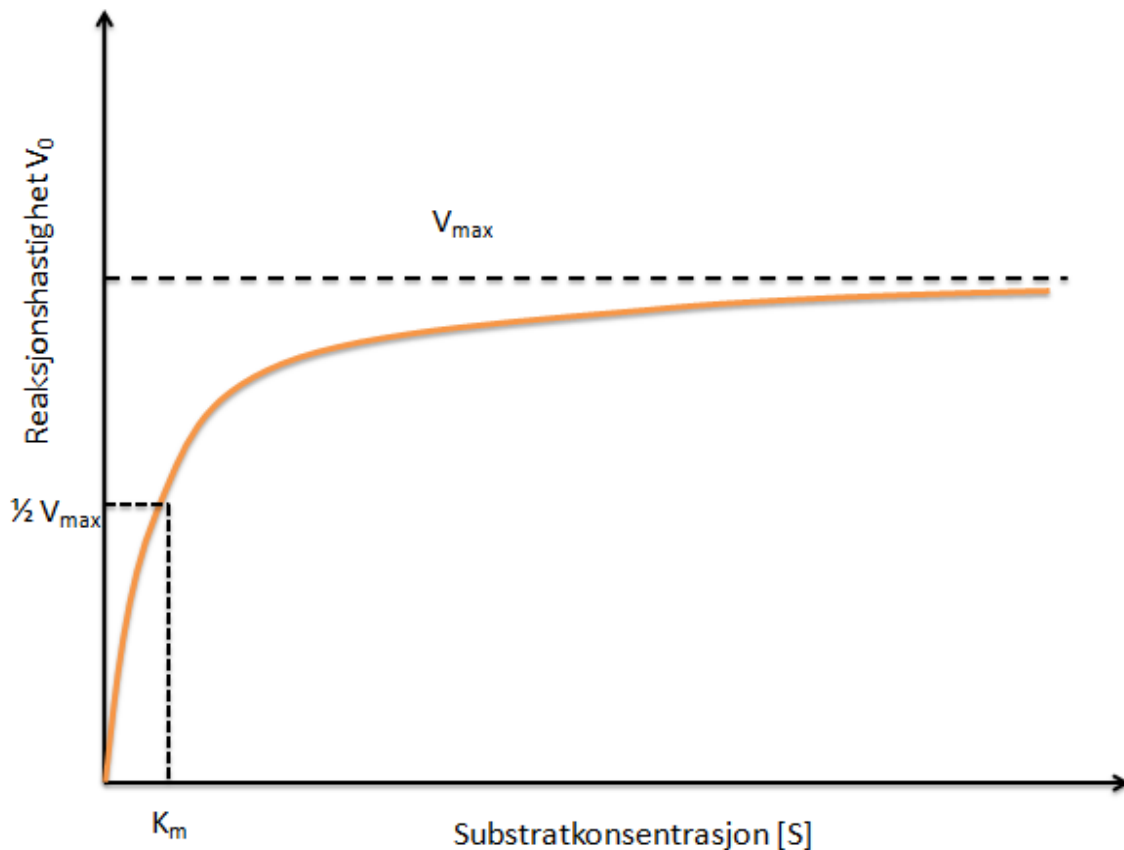
Enzymkinetikk er studien av enzymkatalyserte reaksjoner. For å studere mekanismen bak dette bestemmes hastigheten til reaksjonene, og eksperimentelle parametre endres for å undersøke hvordan hastigheten forandres som følge av dette [19].

### 1.3.1 Michaelis-Menten kinetikk

Klassisk enzymkinetikk regnes å følge Michaelis-Menten-likningen [28]:

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Likning 1})$$

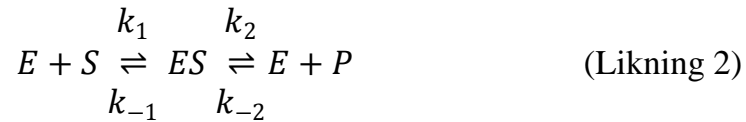
der  $V_0$  står for reaksjonshastighet,  $V_{max}$  er maksimal reaksjonshastighet,  $[S]$  er substratkonsentrasjon, og  $K_m$  er Michaelis-Menten-konstant og tilsvarer substratkonsentrasjonen ved  $\frac{1}{2} V_{max}$  [19]. Likningen uttrykker forholdet mellom  $[S]$  og  $V_0$ , som vises i form av en rektangulær hyperbol kurve (Figur 4). Ut i fra Figur 4 kan man se at reaksjonshastigheten  $V_0$  øker nesten lineært med økende substratkonsentrasjon  $[S]$ , inntil et visst punkt der  $V_0$  er nær maksimal reaksjonshastighet  $V_{max}$  [19].



**Figur 4: Rektangulær hyperbol kurve.** Metabolismen følger Michaelis-Menten kinetikk.

Basert på det kinetiske mønsteret som preger kurveforløpet i Figur 4, fremla Victor Henri, i 1903 teorien om at enzymene bindes til sine respektive substrater og danner enzym-substratkomplekser. Leonor Michaelis og Maud Menten arbeidet videre med

denne teorien, og postulerte i 1913 at enzymene (E) først bindes reversibelt til substratet (S) i et raskt trinn for siden å brytes ned sakte til enzym (E) og produkt (P) [19]:



Basert på reaksjonslikningen ovenfor ser man at enzymet kan eksistere på to former; enten i kompleks som  $ES$ , eller ubundet som  $E$ . Ved lav substratkonsentrasjon  $[S]$  foreligger mer enzym på ubundet form. Reaksjonshastigheten er da proporsjonal med  $[S]$  da likevekten er forskjøvet til høyre; mot dannelsen av mer  $ES$ -kompleks etter hvert som  $[S]$  økes [19]. Den maksimale reaksjonshastigheten  $V_{max}$  observeres når omtrent alt enzym foreligger som kompleks. Videre økning av  $[S]$  vil da ikke føre til vesentlig økning i reaksjonshastigheten, ettersom mengden ubundet enzym er forsvinnende liten, og dette manifesteres i grafen som en utflating av kurven. Man har ved dette punkt oppnådd metning av systemet [19].

Ved å bruke nonlinear regresjon til å passe dataene til Michaelis-Menten-likningen etter *in vitro*-kinetikkstudier, kan parameterne  $K_m$  og  $V_{max}$  estimeres. Disse kan videre brukes som basis for å sammenlikne substrater, og til å forutsi *in vivo*-clearance eller legemiddelinteraksjoner [29]. Michaelis-Menten-likningen (Likning 1) kan også skrives på følgende måte [30]

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m + [S]} \quad (\text{Likning 3})$$

ettersom

$$CL_{int} = \frac{v_0}{[S]} \quad (\text{Likning 4})$$

Ved første ordens kinetikk kan Likning 3 forenkles til

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m} \quad (\text{Likning 5})$$

da man antar at  $[S] \ll K_m$  [19]. Clearance intrinsic ( $CL_{int}$ ) er den maksimale metabolismekapasiteten til det eliminerende organet [1].

### 1.3.2 Atypisk kinetikk

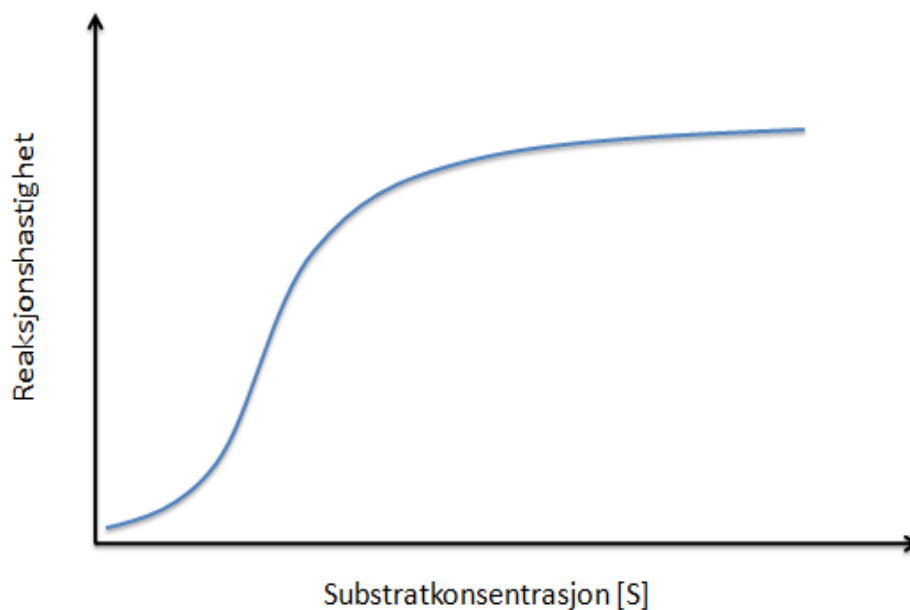
Det var lenge antatt at all human legemiddelmetabolisme katalysert av enzymer foreløp i henhold metningskinetikkenes hyperbole kurve (Figur 4), og at dataene kunne modelleres etter Michaelis-Menten-likningen (Likning 1). Etter hvert har man imidlertid funnet at flere av enzymene som deltar i legemiddelmetabolisme (blant annet CYP-enzymene) utviser atypiske kinetikkprofiler *in vitro*. I starten ble slike forskningsresultater avfeid som eksperimentelle feil eller ignorert, men i de senere år har man akseptert at det finnes substrater som utviser ulike typer atypisk kinetikk *in vitro* [29]. Man vet at to eller flere substratmolekyler kan bindes samtidig til enzymets aktive sete, og man har akseptert at dette kan spille en rolle i atypisk kinetikk som ses for visse substrater og enzymer, skjønt den fullstendige mekanismen enda er ukjent [29]. Av enzymene som assosieres med atypisk kinetikk er CYP3A4 det enzymet av størst betydning [21]. Man vet at CYP3A4 har et stort aktivt sete og man tror, som nevnt tidligere, at dette kan tillate binding av flere molekyler samtidig [21, 31, 32] avhengig av type substrat, konsentrasjon av substrat, og affiniteten substratet utviser for enzymet [21]. Det er antatt at atypisk kinetikk faller inn i en av fire kategorier; autoaktivering, aktivering, bifasisk kinetikk, substrathemning [29].

Autoaktivering er en variant atypisk kinetikk som involverer positiv homotrop kooperativitet. Begrepet positiv homotrop kooperativitet brukes når to eller flere molekyler av samme substrat bindes samtidig til enzymets aktive sete [33] og aktiverer sin egen metabolisme [28]. Som resultat av denne egenaktiveringen oppnås en sigmoidal kinetisk profil (Figur 5) [28, 29]. For best å kunne estimere de kinetiske parameterne ved autoaktivering, benyttes Hill-likningen [28, 29]

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]^n}{K' + [S]^n} \quad (\text{Likning 7})$$

der  $K'$  er en konstant som består av interaksjonsfaktorer, og tilsvarer *ikke*  $K_m$  med mindre  $n = 1$  [34]. Verdien til  $n$  gjenspeiler graden av kooperativitet [29], det vil si graden av interaksjon mellom bindingsstedene [19]. Dersom  $n > 1$  indikerer dette positiv kooperativitet [19]. Jo mer kooperativitet, desto større blir  $n$  [29]. Den øvre grensen for  $n$  er når verdien av denne tilsvarer antall bindingssteder i enzymet. Da vil man oppnå absolutt metning av de aktive setene og har fullstendig kooperativitet i substratbinding [19].

En liknende variant av atypisk kinetikk er *aktivering*, også kalt positiv heterotrop kooperativitet. I disse tilfellene bindes effektormolekyler til enzymene samtidig som binding av substratmolekyler. Effektormolekylene er, i motsetning til autoaktivering, forskjellige fra substratmolekylene (derav betegnelsen heterotrop kooperativitet), men kan likevel gi økt metabolisme av substratet gjennom økning av enzymenes aktivitet [29].



**Figur 5: Sigmoid kurve som beskriver positiv homotrop kooperativitet.**

### 1.3.3 Enzymhemning

Enzymaktiviteten kan endres som resultat av xenobiotikas innvirkning på enzymene, enten via induksjon eller hemning [1, 15]. Enzymhemning kan deles inn i reversibel hemning, og (kvasi-) irreversibel hemning [17].

#### *Reversibel hemning*

Reversibel hemning kan videre deles i flere grupper avhengig av hvilke mekanismer som ligger bakenfor og hvordan hemningen manifesterer seg. Ved kompetitiv hemning konkurrerer hemmeren med substratet om binding i det aktive setet. Man kan eliminere den konkurrerende hemningen ved å tilføre mer substrat, som da vil utkonkurrere hemmeren [17]. En non-kompetitiv hemmer vil binde seg til et annet sted på enzymet enn det aktive setet for substratet, og har dermed ingen effekt på binding av substratmolekyl [17]. Denne type hemning vil ikke kunne omgås ved videre tilsats av substrat, men kan reverseres da hemmeren kan dissosiere fra enzymet, slik at enzymets katalytiske aktivitet gjenopptas. Ved un-kompetitiv hemning bindes hemmeren til enzym-substratkomplekset, og hindrer omdannelse av substrat eller hindrer metabolitten i å slippe enzymet etter omdannelse [17]. Dette er heller ikke en type hemning som kan utkonkurreres ved økt substratkonsentrasjon, men den er reversibel og enzymaktiviteten kan gjenoppnås dersom hemmeren slipper komplekset slik at metabolitten får fjernet seg fra det aktive setet.

#### *Irreversibel og kvasi-irreversibel hemning*

Kvasi-irreversibel hemning skyldes dannelselse av reaktive metabolitter som danner et ikke-kovalent, men likevel sterkt bundet metabolsk intermediatkompleks (MIC). Ved irreversibel hemning dannes det også et MIC, men i dette tilfellet er det kovalent bundet til enzymets hem og/eller protein, og hemmer dets katalytiske aktivitet. Enzymaktiviteten kan ved kvasi-irreversibel og irreversibel hemning kun gjenoppnås ved nydannelse av enzym [17]. På grunn av dette vil en interaksjon mellom en (kvasi-) irreversibel hemmer og et substrat for det hemmede CYP-enzymet kunne få mer alvorlige følger enn ved reversibel hemning. Kvasi-irreversibel og irreversibel hemning betegnes gjerne som tidsavhengig hemning da man oppnår større grad av

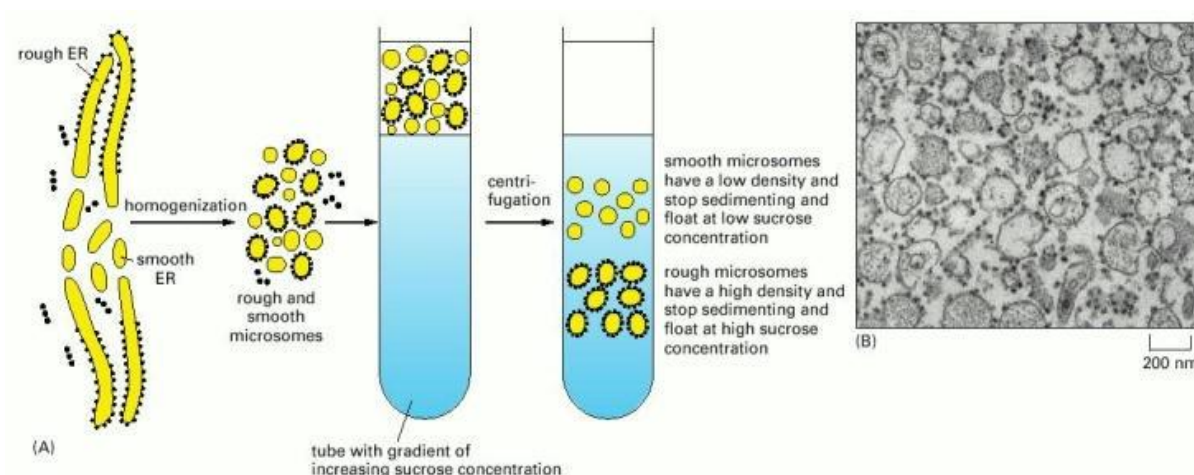
hemning desto lenger hemmeren er i kontakt med enzymet, og kan også omtales som mekanismebasert hemning [17, 35].

## 1.4 *In vitro*-modeller

*In vitro*-studier anvendes tidlig i legemiddelutviklingen for å karakterisere metabolske egenskaper ved det nye legemidlet, samt å identifisere potensielle interaksjoner mellom dette og andre legemidler [36]. Ettersom resultater fra *in vitro*-studier skal ekstrapoleres pålitelig til kliniske data *in vivo*, bør *in vitro*-modeller som anvendes representere *in vivo*-forholdene de modellerer [36, 37]. *In vitro*-modellene vil imidlertid alltid være et kompromiss mellom hvilke modeller som er relevante og hva som er praktisk mulig å gjennomføre [37]. Resultater fra *in vitro*-studier kan i flere tilfeller kreve *in vivo*-studier i dyr for å oppnå mer nøyaktige data [38, 39].

### 1.4.1 Humane levermikrosomer

Det er laget flere *in vitro*-modeller som brukes for å studere kinetikken til legemidler, og av disse er humane levermikrosomer (HLM) det mest anvendte systemet [36]. Mikrosomer er små, lukkede vesikler fra endoplasmatiske retikulum (ER) og dannes



**Figur 6: Humane levermikrosomer.** Celler fra human lever homogeniseres og det dannes slik mikrosomer [41].

ved homogenisering av celler eller vev (Figur 6) [40]. Flere av fase 1 og 2-enzymene, blant annet CYP og UDP-glukuronosyltransferaser (UGT), sitter festet til ER i

områder omtalt som glatt endoplasmatisk retikulum [1, 40]. Ettersom den høyeste konsentrasjonen av metaboliserende enzymer finnes i hepatocytter [1, 3] vil homogenisering av humane leverceller gi opphav til mikrosomer med fortrinnsvis CYP og UGT [37]. Aktiviteten til HLM kan variere signifikant som følge av naturlig interindividuell variasjon. Dette unngås ved å slå sammen vevsprøver fra flere individer slik at den resulterende mikrosomløsningen har en mer representativ enzymaktivitet for den gjeldende populasjonen [37]. Det er flere fordeler ved å anvende HLM kontra andre modeller i *in vitro*-studier, da HLM enkelt kan produseres selv eller kjøpes kommersielt. De er dessuten enkle å anvende, er stabile ved lagring over lengre tid, og gir resultater som enkelt kan reproduseres [36, 37]. I tillegg er denne modellen svært godt karakterisert for bruk i metabolismestudier [41]. Det er imidlertid også svakheter ved HLM-modellen. Metabolismestudier i HLM kan gi til dels feilaktige resultater dersom dannelsen av visse metabolitter avhenger av andre enzymer enn de som er tilstede i ER [37].

#### **1.4.2 Rekombinant *in vitro*-modell**

*In vitro*-modeller, der cDNA for de ønskede enzymene er transfektert inn i insektceller, kan brukes i metabolismeforskning ettersom insektceller hverken har endogent CYP eller UGT [37]. Slike *in vitro*-systemer omtales gjerne som baculosomer, skjønt den vanligste betegnelsen er supersomer etter handelsnavnet Supersomes<sup>TM</sup> [37]. Ettersom det i rekombinante *in vitro*-modeller kan uttrykkes selektive CYP- og UGT-enzymene kan man bruke modellen til studier av isozymspesifikk legemiddelmetabolisme samt legemiddelinteraksjoner [37]. Ved bruk av dette systemet kan man i tillegg studere innflytelsen av polymorfisme på legemidlers metabolismemønster, da supersomer med ulike genetiske varianter av CYP finnes kommersielt tilgjengelig [36, 37, 42]. En ulempe ved bruk av supersomer er at bidraget fra andre enzymer ikke vil detekteres ettersom enzymene kun uttrykkes enkeltvis [36]. På grunn av dette anvendes supersomer ofte i kombinasjon med andre *in vitro*-modeller [36].



### 1.4.3 Hepatocytter

Som tidligere nevnt bør *in vitro*-systemer etterlikne *in vivo*-forholdene de modellerer [36, 37]. Hepatocytter, som bidrar til det meste av legemiddelmetabolisme, utgjør ca 90 % av leverens celler, og vil derfor egne seg godt som *in vitro*-modell for leverens metabolisme [1, 37, 39]. Til forskjell fra HLM og supersomer vil hepatocytterne ha et fullstendig, legemiddelmetaboliserende enzymesystem med tilhørende kofaktorer i integrert form [36]. Hepatocytter kan isoleres fra vev ved større eller mindre kirurgiske inngrep som henholdsvis transplantasjoner eller biopsier [36]. Tilgjengeligheten av ferske vevsprøver av lever, særlig frisk lever, er likevel begrenset og hindrer derfor utstrakt bruk av hepatocytter som *in vitro*-system [36, 43]. Ytterligere begrensende faktorer er tap av differensierte funksjoner, som CYP-aktivitet, kort tid etter kultivering [44]. Kryopreserverte hepatocytter kan imidlertid brukes som et alternativ til hepatocytter fra ferske vevsprøver [44]. Ved kryopreservering fryses cellene ved en prosess som stanser all biologisk aktivitet, og man kan dermed lagre cellene inntil de skal anvendes, uten degradering av metabolsk kapasitet [36, 44]. Ved bruk av kryopreserverte hepatocytter i *in vitro*-studier unngår man variabilitet i cellepreparater i tillegg til tilgjengelighetsproblematikk, som da gir forskere bedre mulighet til planlegging av studier [43, 44]. Det er imidlertid også ulemper ved bruk av kryopreserverte hepatocyttsystemer, da man også i dette systemet har observert reduksjon i CYP-aktivitet [43]. Mangelen på non-hepatocytiske celler, som for eksempel Kupffer celler, kan dessuten bidra til feilaktig metabolismemønster dersom disse bidrar til metabolismen ved tilførsel av kofaktorer [37].

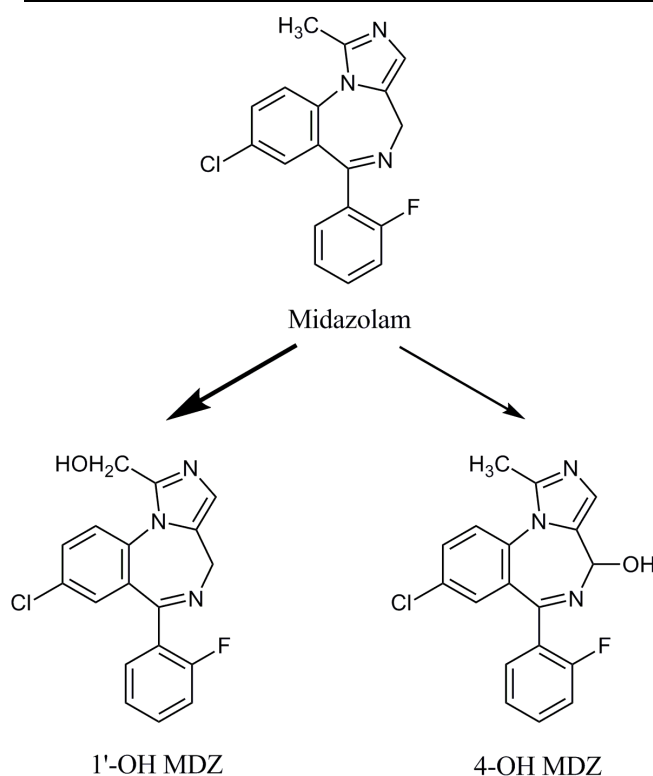
### 1.4.4 Leverstykker

Ettersom leveren er hovedorganet for legemiddelmetabolisme, vil det være gunstigst å bruke en *in vitro*-modell som etterlikner hele leverens metaboliserende effekt. Da det er vanskelig å få tak i intakt lever til *in vitro*-studier, særlig human lever, er leverstykker den *in vitro*-modellen som best representerer *in vivo*-forholdene i lever [36, 37]. Dette skyldes hovedsakelig leverstykkenes tredimensjonale struktur med

intakte intercellulære forhold og uskadde celleform [36]. Leverstykkene er dessuten multicellulære og innbefatter både hepatocytter med fase 1 og 2-enzym, i tillegg til non-hepatocytter som er viktige i blant annet organiseringen av vevet og generell celfunksjon [36]. I likhet med hepatocytter er også tilgjengeligheten på ferskt vev for leverstykker utilstrekkelig. Dette sett i sammenheng med kort levetid for leverstykkene, begrenser bruken av denne *in vitro*-modellen [36]. I tillegg vil resultatene fra *in vitro*-studier med leverstykker variere betydelig avhengig av tykkelsen på stykkene, da økt tykkelse gir redusert diffusjon av medium til de innerste levercellene i stykket [37, 45].

## 1.5 Midazolam

Midazolam (MDZ) er et benzodiazepin som i all hovedsak brukes for anestesi ved diagnostiske eller terapeutiske inngrep [46, 47]. Effekten medieres gjennom selektiv binding av midazolammolekylet til regulatoriske områder på GABA<sub>A</sub> reseptoren (gamma-aminosmørsyre reseptor A), og øker slik affiniteten for GABA-binding [2]. Binding av GABA aktiverer reseptoren og fører til økt permeabilitet for kloridioner. Dette hyperpolariserer cellemembranen, gir redusert eksitabilitet av cellen [2], og resulterer i sedativ og muskelrelakserende effekt hos pasienten [47]. MDZ har kort halveringstid som følge av hurtig omdannelse i lever [46, 47], og metabolismen skjer via CYP3A-enzymene, hovedsakelig CYP3A4 [48-50]. Det dannes to metabolitter av MDZ, henholdsvis 1'-hydroksymidazolam (1'-OH MDZ), og 4-hydroksymidazolam (4-OH MDZ) [49, 51], der 1'-OH MDZ er primærmetabolitten (Figur 7) [47, 52]. Etter fase 1 metabolismen konjugeres metabolittene, og skilles deretter ut via nyrene [47].



**Figur 7: Dannelse av hovedmetabolitten 1'-OH MDZ, og 4-OH MDZ.**

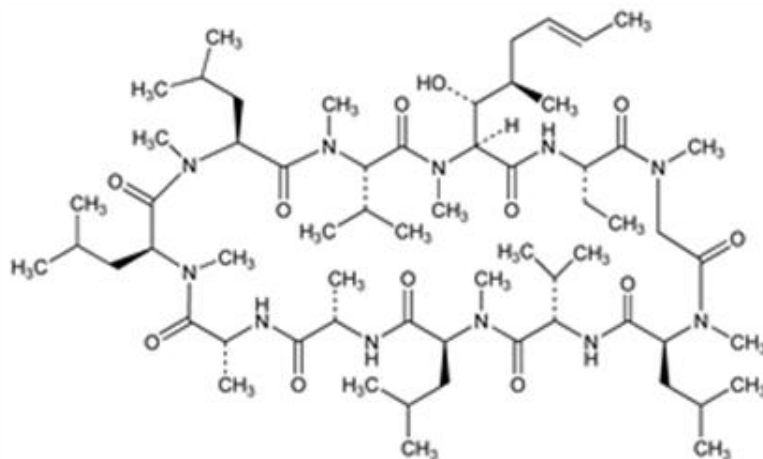
MDZ innehar flere gunstige karakteristika med tanke på bruk som probe i *in vitro*- og *in vivo*-studier [50]. På grunn av MDZs raskt innsettende effekt og korte halveringstid ( $t_{1/2} = 1,5-2,5$  timer) [48] kan man opparbeide farmakokinetiske endepunkter, som for eksempel AUC- kurve, kort tid etter administrering av dose [52]. Som nevnt tidligere metaboliseres MDZ kun av CYP3A-familien [49] og påvirkes heller ikke av andre transportere som for eksempel P-glykoprotein [50]. Metabolismen av MDZ kan dessuten korreleres til CYP3A-aktivitet i både

tarm og lever, og vil lett påvirkes av hemning, induksjon og interindividuell variasjon [50]. MDZ har i tillegg få rapporterte bivirkninger som kan komme til uttrykk ved *in vivo*-studier [47, 50]. Disse egenskapene sett sammen er grunnlaget for at MDZ er preferert substans til bruk som modellsubstrat ved *in vitro*- og *in vivo*-studier av CYP3A-metabolisme [50].

## 1.6 Cyclosporin A

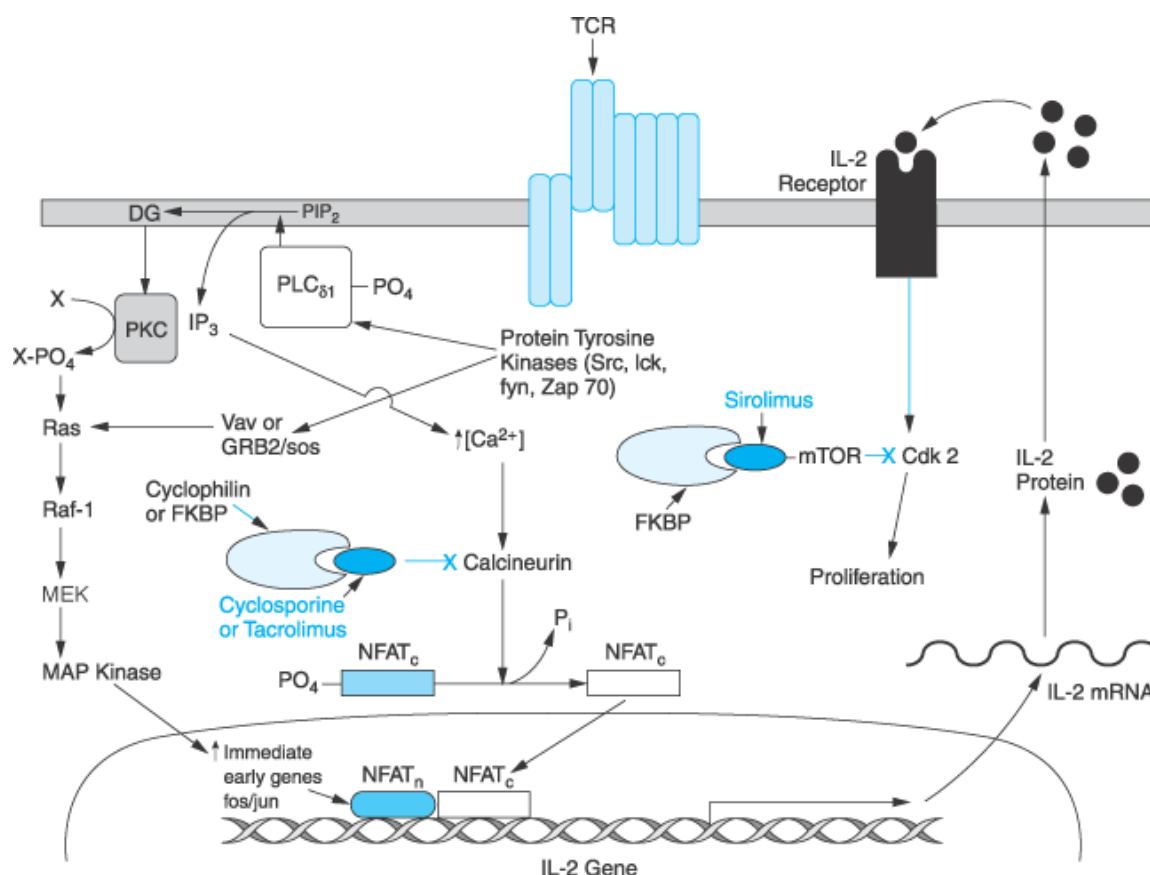
Cyclosporiner produseres av en sopp; *Tolypocladium inflatum* Gams, og ble første gang oppdaget i 1969 etter screening av en jordprøve, hentet fra Hardangervidda i Norge av Dr Hans Peter Frey fra Sandoz [48, 53].

Cyclosporin-familien er en gruppe upolare sykliske oligopeptider med kalsinevrinhemmende effekt på immunsystemet, og av alle cyclosporiner (A til Z) er cyclosporin A (CsA) (INN: ciclosporin [54]) hovedvarianten (Figur 8) [55].



*Figur 8: Strukturformel for Cyclosporin A [55].*

Kalsinevrin er en cytoplasmatisk fosfatase som defosforylerer en type transkripsjonsfaktor kalt NFAT (Nukleær Faktor av Aktiverte T-celler) [56]. Dette fører til at NFAT aktiveres og translokerer til cellekjernen, der det danner kompleks med andre transkripsjonsfaktorer. Kompleksdannelsen starter transkripsjon av genet for interleukin-2 (IL-2) [56], som kreves for å fullføre T-celleaktivering [1]. CsA hemmer disse intracellulære signaleringsveiene, induisert som følge av T-cellereseptoraktivering, ved å binde seg til et cytoplasmatisk isomeraseenzym kalt cyclophilin, og danne et kompleks som videre bindes til kalsinevrin (Figur 9) [1, 56]. En interaksjon mellom cyclosporin-cyclophilinkomplekset og kalsinevrin vil resultere i hemning av den katalytiske defosforyleringsaktiviteten til kalsinevrin og hindrer dermed aktivering av NFAT. Det vil i nærvær av CsA derfor ikke produseres IL-2, og aktivering av T-celler, så vel som proliferasjonen og differensieringen av disse, stanses [56].



**Figur 9: Virkningsmekanisme CsA.** CsA bindes til cyclophillin og danner et kompleks, som videre bindes til kalsinevrin. Dette hindrer defosforylering av NFAT, som ettersom denne da ikke translokerer til cellekjernen, stanses produksjonen av interleukin-2 [1].

Oppdagelsen av CsA førte til at verden entret en ny æra innen organtransplantasjon ettersom det da ble mulig å gjennomføre flere ulike organtransplantasjoner [1]. CsA brukes hovedsakelig ved organ- og stamcelletransplantasjon, men benyttes også ved reumatoid artritt og andre autoimmune sykdommer på bakgrunn av CsA immunmodulerende effekt [46].

Bruk av CsA har visse farmakokinetiske utfordringer, blant annet på grunnlag av legemidlets svært dårlige vannløselighet [48]. Ettersom absorpsjon over tarmcellene krever at substansen er løst i galle, vil dårlig vannløselighet være svært begrensende på opptaket over epitelcellene i tynntarm [57-59]. CsA er i tillegg utsatt for førstepassasjemetabolisme i enterocytene i tarmveggen og i leverens hepatocytter da CsA er substrat for CYP3A4 [48, 60, 61]. Generelt regnes biotilgjengeligheten for CsA å være mellom 30-60 % av dosen som inntas, men på grunn av høy grad av binding til blodceller og plasmaproteiner foreligger kun ca 3 % som fri fraksjon i blod

[62, 63]. Eliminering av CsA og dets 15 metabolitter skjer hovedsakelig gjennom utskillelse i galle, fortrinnsvis etter metabolisme via CYP3A4 [60, 62].

Den lave biotilgjengeligheten som observeres for CsA kan økes ved å redusere førstepassasjemetabolismen forårsaket av CYP3A4. Ved koadministrering av visse typer matvarer eller legemidler med CsA, kan CYP3A4-enzymene i tarm og lever hemmes, og derved føre til høyere AUC for CsA [1, 3, 18]. Hemning av enzymaktivitet i lever vil imidlertid også redusere elimineringen av CsA, og ved lavere metabolismeaktivitet akkumuleres CsA og gir forhøyet plasmakonsentrasjon over en viss periode [3]. Ettersom CsA har et smalt terapeutisk område [64] kan økt konsentrasjon bidra til bivirkninger som for eksempel akutt eller kronisk nyresvikt ved nefrotoksisitet [46, 62]. Koadministrering av legemidler og matvarer med induserende effekt på CYP3A4 reduserer derimot biotilgjengeligheten for CsA ved å øke førstepassasjemetabolisme og eliminering [1, 62]. Dette vil føre til for lav plasmakonsentrasjon av CsA til å kunne hemme immunforsvaret tilstrekkelig, og kan gi graftreksjon [1]. På grunn av dette bør samtidig inntak av interagerende substanser sammen med CsA overvåkes nøye for å unngå uønskede hendelser [1, 62].

## 1.7 Bakgrunn for oppgaven

Bruken av CsA i organtransplanterte pasienter er ofte forbundet med utvikling av hyperlipidemi [48, 62]. Hyperlipidemi vil i organtransplanterte pasienter være en risikofaktor for allograft vaskulopati, som eksempelvis videre kan lede til kronisk reksjon av nyregraft [65], og blir derfor behandlet med lipidsenkende legemidler som for eksempel statiner (HMG-CoA reduktasehemmere) [65]. Kombinasjonen av CsA og visse typer statiner, som for eksempel atorvastatin har i flere tilfeller gitt økt AUC av statinet [66-68]. En slik økning i plasmakonsentrasjon kan gi statininduserte muskelbivirkninger som myopati og, i sjeldne tilfeller rabdomyolyse [65, 69, 70]. Selv om mekanismen bak denne interaksjonen ikke er fullstendig klarlagt, er hemning av P-glykoprotein (P-gp), organisk aniontransporterende polypeptid 1B1 (OATP1B1), og CYP3A4, som følge av CsA, foreslått som mulige årsaker [64]. P-gp sitter i cellemembranen til blant annet hepatocytter og enterocytter, og pumper

xenobiotiske stoffer aktivt ut av cellene [1]. Ettersom atorvastatin er substrat for P-gp [48] og CsA er funnet å hemme denne transporteren [48], vil koadministrering av disse legemidlene følgelig føre til økt AUC for atorvastatin [67]. Dersom hemning av P-gp var den eneste mekanismen ansvarlig for økt AUC ved nevnte legemiddelkombinasjon, burde lipidnivåene bli redusert som følge av økt biotilgjengelighet av atorvastatin i hepatocytene. Det er imidlertid blitt observert liten grad av lipidsenkning ved koadministrering av CsA og atorvastatin, noe som dermed tyder på at også andre mekanismer er involvert i interaksjonen [66, 67]. Det er i tillegg funnet at CsA hemmer OATP1B1 [71, 72], og det antas at denne mekanismen er av stor betydning for de observerte interaksjonene mellom CsA og statiner [72]. OATP1B1 sitter, i likhet med P-gp, i cellemembranen til hepatocytter, men transporterer xenobiotiske stoffer, som for eksempel atorvastatin, *inn* i cellene [1]. Hemning av OATP1B1 vil, til forskjell fra P-gp føre til mindre atorvastatin i hepatocytene, som igjen gir mindre lipidsenkning ettersom hepatocytene er statinenes hovedsakelige virkeområde [66, 67]. Hemning av CYP3A4 som følge av CsA har vært antatt å være av mindre betydning ved denne interaksjonen, da det er observert økt AUC selv ved CsA i kombinasjon med statiner som *ikke* metaboliseres via CYP3A4 [67, 73-75]. AUC-verdiene for de ulike statinene i kombinasjon med hemmer av CYP3A4 er imidlertid økt med varierende faktorer [66, 67, 73-75]. Dette kan tyde på at CsA-mediert hemning av CYP3A4 likevel kan være involvert i interaksjonsmekanismen ved statiner som *er* CYP3A4-substrater, som for eksempel atorvastatin. I tillegg står flere organtransplanterte pasienter på omfattende legemiddelregimer, og ettersom CYP3A-familien er ansvarlige for metabolismen av ca 50 % av de markedsførte legemidlene [1], vil karakterisering av CsAs effekt på CYP3A4 være av generell interesse for potensielle legemiddelinteraksjoner i denne pasientgruppen.

### 1.7.1 Hensikt

Hensikten med denne oppgaven var å studere CsAs hemning av CYP3A4 og CYP3A5, med anvendelse av MDZ som probesubstrat. Det skulle i tillegg undersøkes om hemningen var mekanismebasert ved å sammenlikne ko- og

preinkuberingsforsøk, med CsA og insektmikrosomer som spesifikt uttrykket CYP3A4 eller CYP3A5.

Ettersom CsA har svært dårlig løselighet og er beskrevet å adsorbere til silikonbehandlede overflater, skulle det innledningsvis utføres forsøk for å vurdere effekten av DMSO og ikke-silikonbehandlede glassrør versus silikonbehandlede glassrør i metabolismeforskene.



## 2. Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

#### 2.1.1 Utstyr

Utstyr	Produsent
Autoinjektor SIL-10AD VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Datasystem programvare, Class VP Chromatography, versjon 4.3	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Detektor massespektrometer LCMS-2010A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Forkolonne Inertsil C8-3, 5 µm, 3,0x10mm	GL Sciences Inc, Tokyo, Japan
Ionebyttet vann	EASYpure UV, Barnstead
Kolonne Inertsil C8-3, 5µm, 3,0x50mm	GL Sciences Inc, Tokyo, Japan
pH-meter Beckman 50 pH meter	Beckman Instruments Inc, Fullerton, CA, USA
Pumper LC-10AP VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Sentrifuge universal 32 R	Hettlich zentrifugen, Tyskland
Silikonbehandlede glassrør 3ml og 10 ml	Venoject, Terumo, Leuven, Belgia
Switch FCV-12AH	Shimadzu, Kyoto, Japan
Systemkontroller SCL-10A VP	Shimadzu, Kyoto, Japan
Vannbad	Gallenkamp, England
Vekt AB54	Mettler-Toledo Inc., Columbus, OH, USA
Whirlmikser MS 3 basic	IKA Works Inc, Wilmington NC, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc, La Joll, CA, USA
Microsoft Office Excel 2007	Micosoft Corporation, Redmond, WA, USA

## 2.1.2 Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent/leverandør
Acetonitril for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniakk	Merck, Darmstadt, Tyskland
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Diazepam gave	Diakonhjemmet sykehus, Oslo, Norge
DMSO	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
EDTA	Ferak, Berlin, Tyskland
HEPES	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Tyskland
Insektmikrosomer med CYP3A4+P450 reduktase +cytokrom b <sub>5</sub> og CYP3A5+P450 reduktase+ cytokrom b <sub>5</sub>	Supersomes <sup>TM</sup> , BD Gentest, Woburn, MA, USA
Maursyre	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Tyskland
MgSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Tyskland
Midazolam gave	F. Hoffmann-La Roche AB, Sveits
N <sub>2</sub> -gass	AGA AS, Oslo, Norge
NADPH	Sigma-Aldich, St.Louis, MO, USA
NaOH	Merck, Darmstadt, Tyskland
Sukrose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Trisma-base	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

## 2.2 Løsninger

Stamløsninger av MDZ, CsA og diazepam (DIA) ble laget ved oppløsning av tørrstoff i metanol (henholdsvis 1 mM, 830 µM og 4,4 µM). Det ble laget standardløsninger av MDZ og CsA der de respektive stamløsningene ble fortynnet i metanol til ønsket konsentrasjon (MDZ: 100 µM, CsA: 8,3 µM og 83 µM). Både

stamløsningene og standardløsningene ble oppbevart i fryser ved -20 °C. Det ble laget fersk internstandardløsning av diazepam (DIA) til hvert forsøk, ved fortynning av stamløsningen med acetonitril til 0,044 µM. Inkubasjonsløsningen bestod av 200 mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub> og 10 mM NADPH. Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ble laget av Trismabase, løst i ionebyttet vann, og titrert til pH 7,5 ved hjelp av H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Tørrstoff av MgSO<sub>4</sub> og NADPH ble begge løst i ionebyttet vann. NADPH ble laget fersk til hvert forsøk. Lise Madsen-buffer ble brukt til å fortynne insektmikrosomer og bestod av 0,25 M sukrose, 10 mM HEPES og 2 mM EDTA, løst i ionebyttet vann og titrert til pH 7,4. Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, og Lise Madsen-buffer ble oppbevart i kjøleskap ved ca 6 °C.

## 2.3 Metoder

### 2.3.1 Løselighetsforsøk

Det ble utført et løselighetsforsøk med CsA og DMSO, der 1 % DMSO ble tilsatt i alle prøver. Det ble laget to kontrollprøver; en med 1 % DMSO, som i prøvene, og en uten DMSO for å kunne observere effekten av DMSO på mikrosomene.

Det ble i tillegg testet ut effekten av ikke-silikonbehandlede glassrør på CsAs hemning av CYP3A4, i forhold til silikonbehandlede rør. Det ble i tillegg tilsatt 1 % DMSO i hver prøve for å optimalisere løseligheten av CsA. DMSO ble også tilsatt i kontrollprøven.

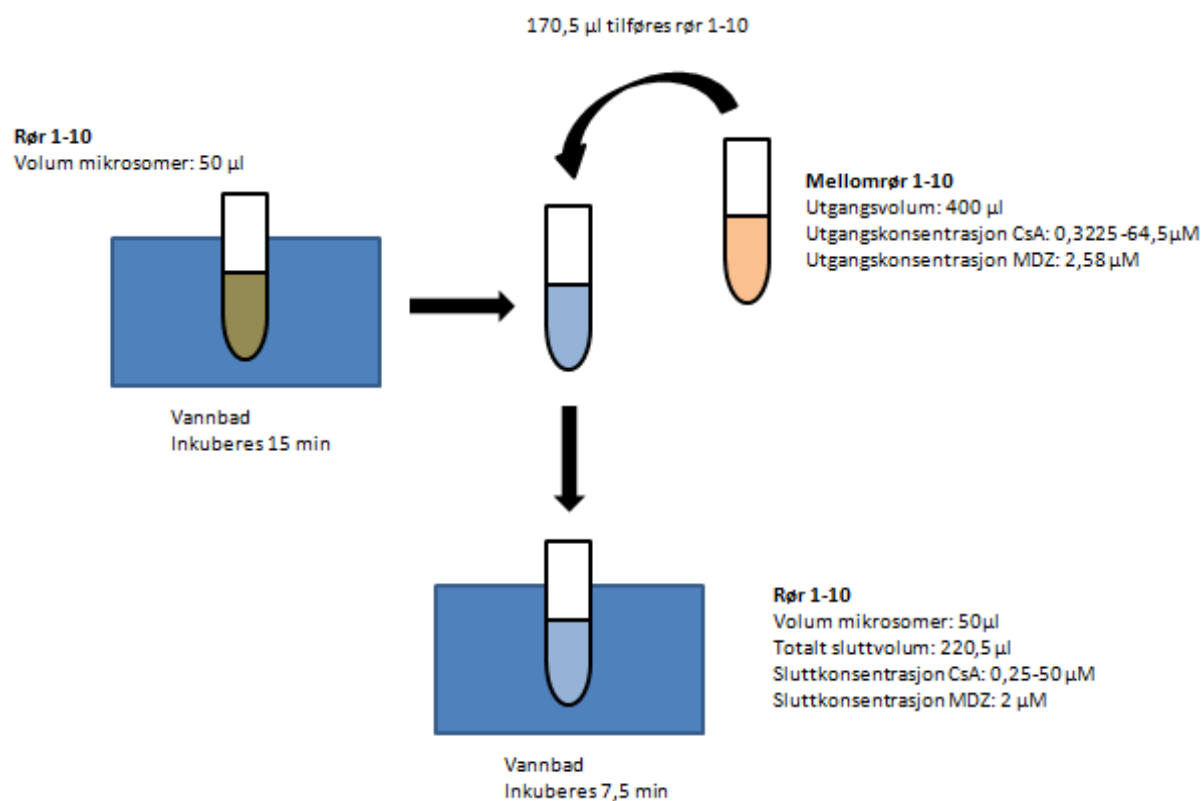
### 2.3.2 Forsøk med cyclosporin A som hemmer

Det ble gjort både koinkubasjonsforsøk og preinkubasjonsforsøk med CsA som hemmer av CYP3A4 og CYP3A5 i rekombinante enzymesystemer (insektmikrosomer). Ved både koinkubering og preinkubering ble det gjort tre forsøk med henholdsvis CYP3A4 og CYP3A5. Hvert forsøk ble utført med 2 paralleller ved hver hemmekonsentrasjon. Ved koinkubasjonsforsøkene ble det laget én kontrollprøve á to paralleller, mens det for preinkubasjonsforsøkene ble benyttet to kontrollprøver á to paralleller. Det ble benyttet MDZ som probesubstrat i både ko- og

preinkubasjonsforsøkene, og sluttkonsentrasjonen ble satt til 2  $\mu\text{M}$ , da dette tidligere er vist å være nær  $K_m$ -verdien [76]. Samme batch supersomer med CYP3A4 ble benyttet ved både ko- og preinkuberingsforsøkene (lot nr. 82636). Ved ko- og preinkubasjonsforsøkene med CYP3A5 ble det imidlertid brukt ulike batcher supersomer (henholdsvis lot nr. 85426 og 44743).

### *Koinkubasjonsforsøk*

Insektmikrosomer ble fortynnet i Lise Madsen-buffer i forholdet 1:64 og videre pipettert over i silikonbehandlede glassrør og satt på is. Total mengde mikrosomløsning i hvert rør var 50  $\mu\text{l}$ . Insektmikrosomene med humant CYP3A4 utviste 23,3 nmol/min cytokrom P450 reduktaseaktivitet, og mengden totalprotein i hvert rør var 5,5  $\mu\text{g}$ . Konsentrasjonen av CYP3A4 i hvert rør var 3,5 nM. Insektmikrosomene med humant CYP3A5 utviste 23,0 nmol/min cytokrom P450



**Figur 10: Fremgangsmåte koinkubasjon.**

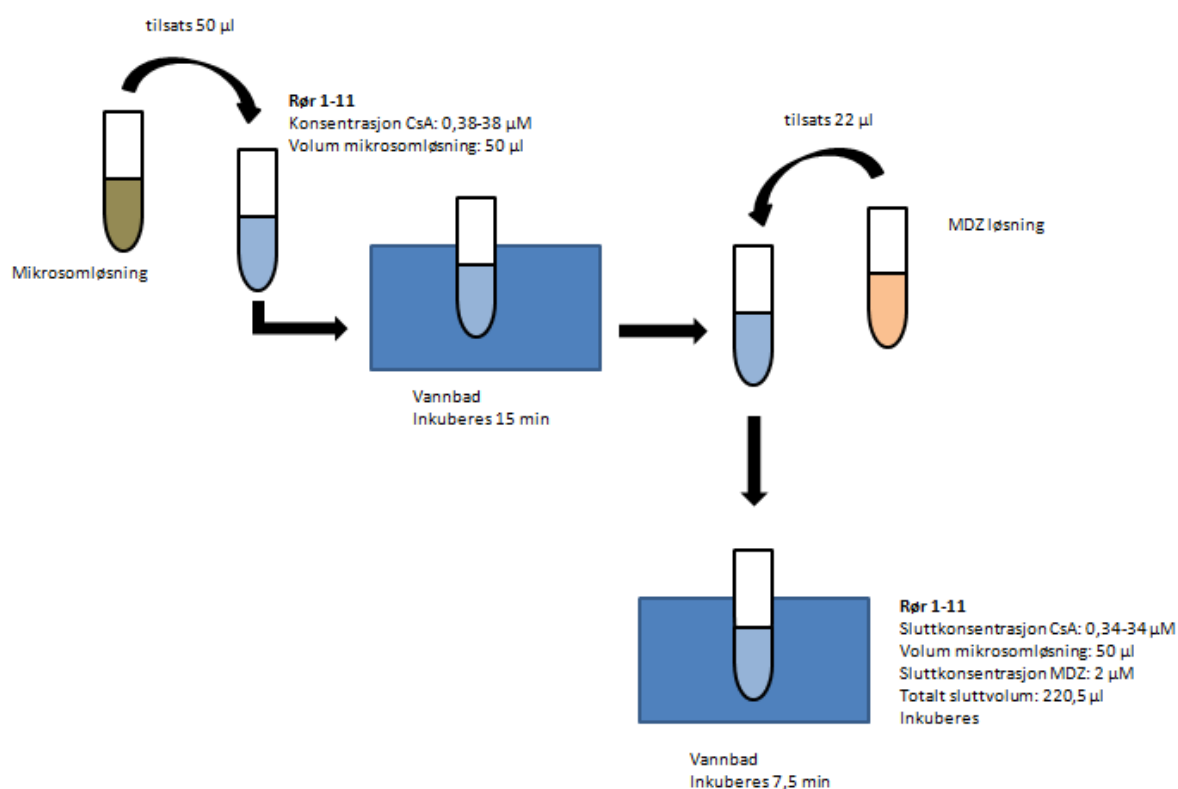
reduktaseaktivitet, og mengden totalprotein i hvert rør var 7,2  $\mu\text{g}$ . Konsentrasjonen CYP3A5 var 3,5 nM i hvert rør. Standardløsning av MDZ i metanol (100 mM) ble pipettert over i mellomrør og mellomkontrollrør (silikonbehandlede glassrør) til ønsket sluttkonsentrasjon på 2  $\mu\text{M}$ . De samme rørene, med unntak av

mellomkontrollrørene, ble tilført stamløsninger av CsA i metanol (10 µg/ml, 100 µg/ml og 1 mg/ml) til ønsket sluttkonsentrasjon (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, 10, 20, 30 og 50 µM). Metanolen i alle mellomrørene (inkludert mellomkontrollrørene) ble deretter dampet bort ved hjelp av N<sub>2</sub>-gass, og det gjenværende tørrstoffet ble reløst i inkubasjonsløsning bestående av 200 mM Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub> og 10 mM NADPH, og whirlmikset. Ettersom tørrstoffet, da særlig CsA, klebet til glassveggen på rørene etter inndamping, ble det brukt metallspatel for å skrape ned stoff som ikke allerede hadde løst seg. Rørene med mikrosomløsning ble preinkubert på vannbad ved 37 °C med risting (trinn 7,5) i 15 minutter. Mellomrørene ble samtidig varmet ved 37 °C i det samme vannbadet i noen minutter. Hemmeforsøket ble initiert ved tilsats av 170,5 µl løsning fra mellomrørene (buffer, MDZ og CsA) og mellomkontrollrørene (buffer og MDZ) til rørene med mikrosomløsning (Figur 10), hvert med 30 sekunders mellomrom. Rørene ble deretter inkubert på vannbad ved 37 °C med risting (trinn 7,5) i 7,5 minutter. Totalt sluttvolum løsning i hvert rør var 220,5 µl, der konsentrasjon NADPH, MgSO<sub>4</sub> og Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> var henholdsvis 1,6 mM, 0,5 mM og 118 mM [76]. Metabolismereaksjonen ble avsluttet ved tilsats av 150 µl iskald acetonitril med 0,044 µM internstandard DIA. Rørene ble deretter whirlmikset og satt på is. Prøvene ble, etter henstand på is i minst 30 minutter, sentrifugert i 5 minutter ved 1600 G og 4 °C. Supernatanten i de sentrifugerte rørene ble deretter pipettert over i vialer for LC-MS analyse. Mellom analyse av prøvene på LC-MS ble vialene lagret i fryser ved -20 °C [76, 77].

### *Preinkubasjonsforsøk*

Løsning av insektmikrosomer i Lise Madsen-buffer ble laget på tilsvarende måte som ved koinkubasjon. Insektmikrosomene med humant CYP3A4 utviste 23,3 nmol/min cytokrom P450 reduktaseaktivitet, og mengden totalprotein i hvert rør var 5,5 µg. Konsentrasjonen av CYP3A4 i hvert rør var 3,5 nM. Insektmikrosomene med humant CYP3A5 utviste 19,0 nmol/min cytokrom P450 reduktaseaktivitet, og mengden totalprotein i hvert rør var 6,6 µg. Konsentrasjonen CYP3A5 var 3,5 nM i hvert rør. Hvert av de silikonbehandlede glassrørene ble tilsatt standardløsninger av CsA i metanol (10 µg/ml, 100 µg/ml og 1 mg/ml) til ønsket sluttkonsentrasjon (0,34, 0,7, 1, 1,4, 1,7, 2,1, 3,4, 7, 14, 21 og 34 µM). Metanolen i rørene ble deretter dampet

av ved hjelp av N<sub>2</sub>-gass, og tørrstoffet av CsA ble reløst i 148,5 µl bufferløsning. Mikrosomløsningen ble etter tillaging lagret midlertidig på is, og ble varmet i noen minutter på vannbad ved 37 °C før bruk. Hvert av rørene med CsA løst i bufferløsning, ble tilsatt 50 µl mikrosomløsning og satt til preinkubasjon på vannbad ved 37 °C med risting (trinn 7,5) i 15 minutter. Etter endt preinkubering ble hvert av rørene tilsatt 22 µl MDZ-løsning hvert 30. sekund, og satt tilbake i vannbad ved 37 °C med risting (trinn 7,5) i 7,5 minutter (Figur 11). Metabolismereaksjonene ble avsluttet ved tilsats av 150 µl iskald løsning av acetonitril med 0,044 µM DIA i hvert

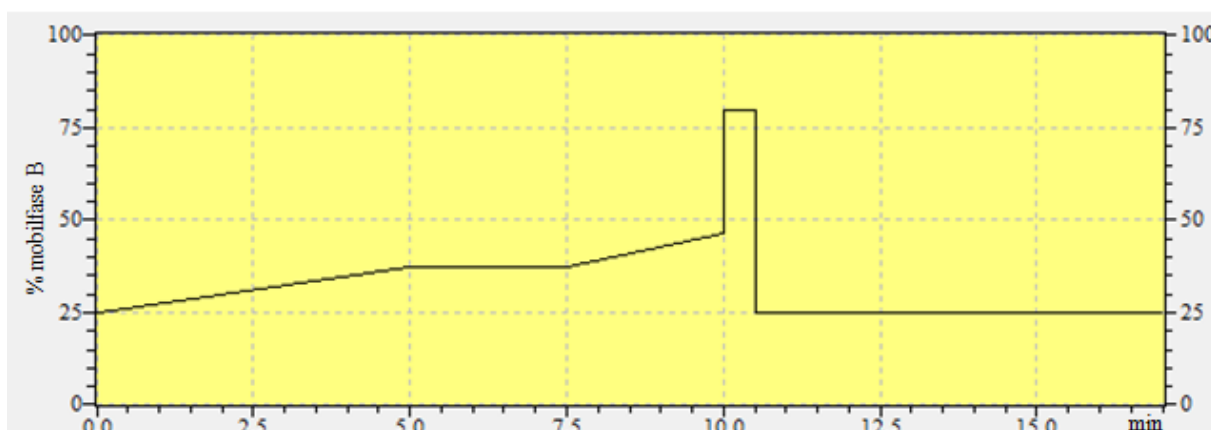


**Figur 11: Fremgangsmåte preinkubasjon.**

av rørene. Rørene ble deretter whirlmikset og satt på is. Etter minst 30 minutter henstand på is ble rørene sentrifugert i 5 minutter ved 1600 G og 4 °C. Supernatanten ble deretter pipettert over i vialer til LC-MS analyse. Mellom analyse av prøvene på LC-MS ble vialene lagret i fryser ved -20 °C.

### 2.3.3 LC-MS analyse

Prøvene ble analysert ved en tidligere validert metode der det ble benyttet væskechromatografi med massespektrometrisk deteksjon (LC-MS) (Shimadzu, Kyoto, Japan) av metabolittene 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ, og DIA [76, 78, 79]. Analyttene ble separert på omvendt-fase C<sub>8</sub> kolonne (3 x 50 mm, 5 µm), med forkolonne (omvendt-fase C<sub>8</sub>, 3 x 10 mm, 5 µm), ved hjelp av gradienteluering med to mobilfaser; mobilfase A (0,05 M ammoniumformiatbuffer, pH 4,4) og mobilfase B



**Figur 12: Gradientkurve.** Prosentvis innhold av mobilfase B gjennom analyseforløpet.

(acetonitril og metanol; 95:5 v/v) (Figur 12). I løpet av de første 5 minuttene etter injeksjon av prøve steg det prosentvise bidraget av mobilfase B fra 25 % til 37,5 %. Denne sammensetningen av mobilfase A og B (hhv 62,5 og 37,5 %) forholdt seg konstant i 2,5 minutter. De neste 2,5 minuttene steg mengde mobilfase B til 46,7 %, for deretter å øke kraftig til 80 %, etter 10 minutter. Reekvilibrering av kolonnen startet 11 minutter etter injeksjon av prøve, og foregikk i 6 minutter. I denne perioden ble mengde mobilfase B redusert til 25 % og holdt konstant frem til analysens avslutning, 17 minutter etter injeksjon av prøve. Gjennom analyseforløpet holdt mobilfasen en hastighet på 0,5 ml/min, for så å øke til 1 ml/min under reekvilibreringen av kolonnen. De første 3 minuttene etter injeksjon av prøve ble mobilfase A ledet utenom kolonnen for å unngå kontaminasjon med høymolekylære forbindelser. Nevnte betingelser gav omtrentlige retensjonstider på 4,8 minutter og 5,9 minutter for henholdsvis 4-OH MDZ og 1'-OH MDZ. DIA ble benyttet som internstandard og hadde retensjonstid på ca 9,6 minutter.

### 2.3.4 Beregning av data

Kromatogrammene etter LC-MS-analyse ble bearbeidet i LC-MC postrun programvare (Class VP Chromatography, versjon 4.3, Shimadzu, Tokyo, Japan). Det ble beregnet topphøyde for hver av toppene til 4-OH MDZ, 1'-OH MDZ og DIA ved hjelp av integrasjon. Disse verdiene ble deretter videre bearbeidet i Microsoft Office Excel 2007 der forholdet mellom metabolittene og internstandard; 4-OH MDZ/DIA og 1'-OH MDZ/DIA ble beregnet. Det ble deretter regnet prosentvis gjenværende enzymaktivitet relativt til kontrollprøvene, som ble satt til 100 %. Dataene ble videre behandlet ved hjelp av Hill-likningen (Likning 7) som enzymkinetisk modell i GraphPad Prism programvare versjon 5, og ut fra denne ble det laget hemmekurver og beregnet  $IC_{50}$ -verdier.  $IC_{50}$ -verdiene ved de tre forsøkene etter ko- og preinkubasjon for både CYP3A4 og CYP3A5, ble beregnet i gjennomsnitt med standard avvik.



### 3. Resultater

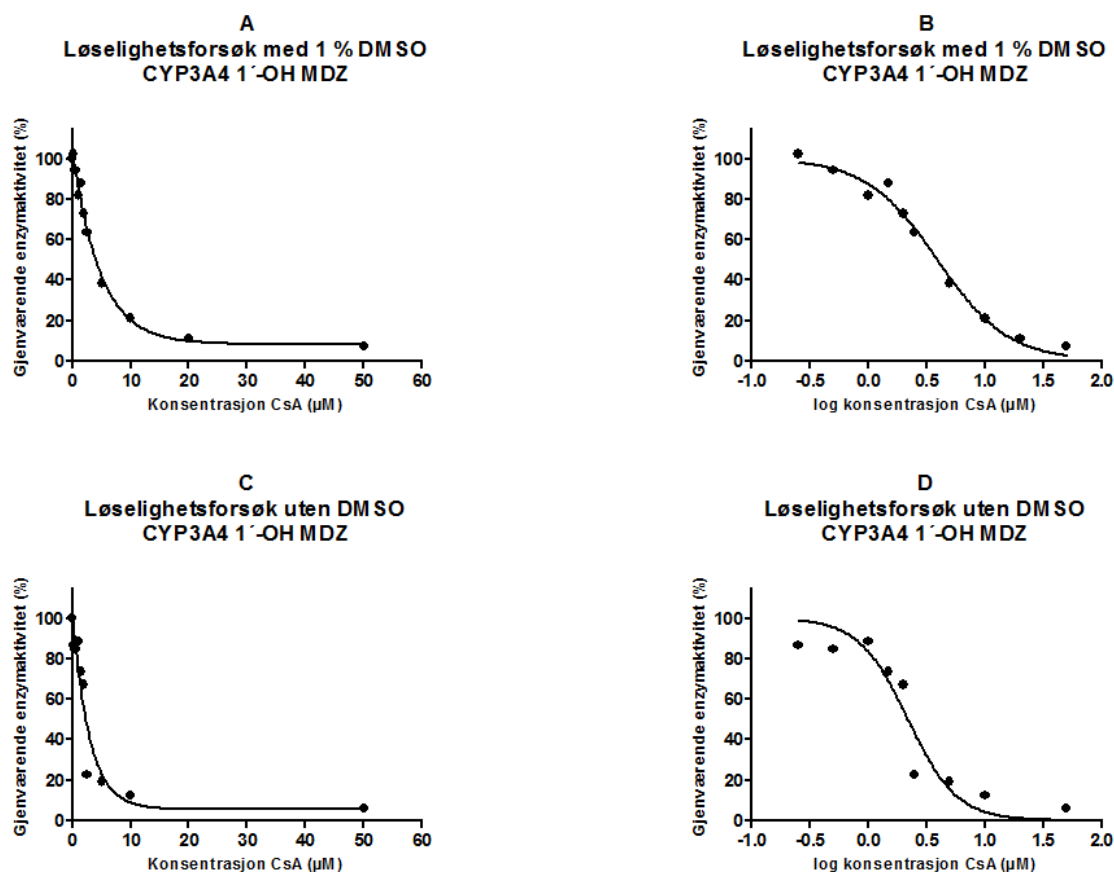
#### 3.1 Løselighetsforsøk

##### 3.1.1 Effekt av DMSO

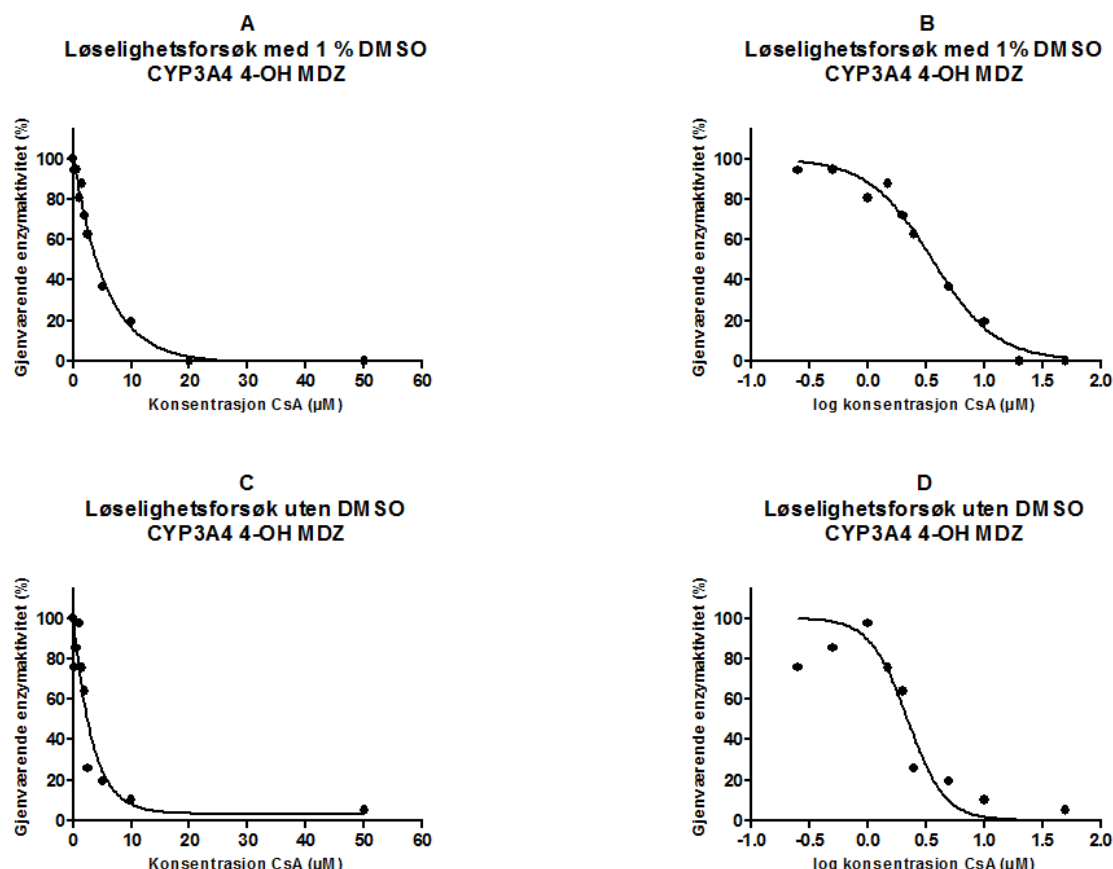
CsA viste en konsentrasjonsavhengig hemning av CYP3A4 gjennom dannelse av både 1'- og 4-OH MDZ, både med og uten tilsetning av DMSO. Det ble observert god korrelasjon ( $r^2$ -verdi = 0,99) med Hill-likningen ved både 1'- og 4-hydroksylering av MDZ etter tilstats av 1 % DMSO i hver prøve (Figur 13B og 14B).  $IC_{50}$ -verdien ble estimert å være 3,9  $\mu$ M ved 1'-hydroksylering av MDZ, mens det ved 4-hydroksylering ble beregnet en  $IC_{50}$ -verdi lik 3,6  $\mu$ M (Figur 13A, B, og 14A, B). Forsøket uten tilsatt DMSO gav en estimert  $IC_{50}$ -verdi på 2,2  $\mu$ M med  $r^2$ -verdi på 0,9.

Ved sammenlikning av grafene og  $r^2$ -verdiene etter forsøket med DMSO og et tidligere forsøk uten DMSO, var det tydelig at løselighetsforsøket med 1 % DMSO gav bedre korrelasjon, både for 1'- og 4-OH MDZ (Figur 13B og D og 14 B og D).

DMSOs effekt på CYP3A4 ble imidlertid undersøkt ved beregning av prosentvis hemning av enzymaktiviteten i kontrollprøven med 1 % DMSO, ut fra kontrollprøve uten DMSO. Det ble funnet at 1 % DMSO i kontrollprøven gav 32 % hemning av enzymaktiviteten ved 1'-hydroksylering av MDZ, mens det ved 4-hydroksylering ble estimert 53 % hemning. På grunnlag av dette, samt at  $IC_{50}$ -verdien ble økt ved tilsats av 1 % DMSO, ble det bestemt ikke å bruke DMSO i videre forsøk.



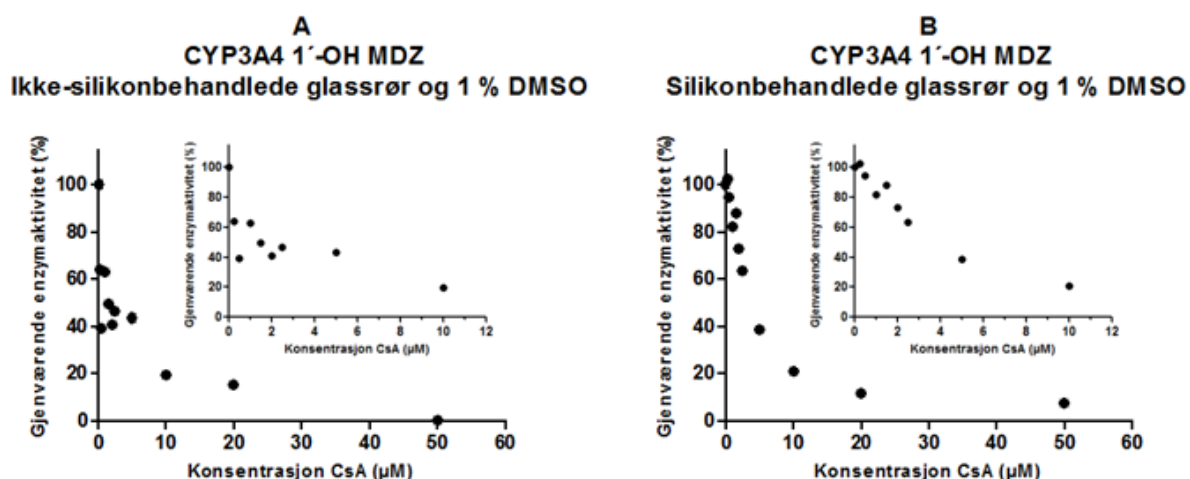
**Figur 13: Sammenlikning av hemmekurver ved 1'-hydroksylering av MDZ med og uten 1 % DMSO. A:** Hemmekurve fra løselighetsforsøk; alle prøver inneholder 1 % DMSO. **B:** Hemmekurve som i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier ( $r^2$ -verdi=0,99). **C:** Kurve fra hemmeforsøk der ingen av prøvene inneholder DMSO. **D:** Hemmekurve som i C, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier ( $r^2$ -verdi= 0,99). Data beskrevet ved Hill-likningen.



**Figur 14: Sammenlikning av hemmekurver ved 4-hydroksylering av MDZ med og uten 1 % DMSO. A:** Hemmekurve fra løselighetsforsøk; alle prøver inneholder 1 % DMSO. **B:** Hemmekurve som i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier ( $r^2$ -verdi= 0,99). **C:** Kurve fra hemmeforsøk der ingen av prøvene inneholder DMSO. **D:** Hemmekurve som i C, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier ( $r^2$ -verdi= 0,87). Data beskrevet ved Hill-likningen.

### 3.1.2 Effekt av silikonbehandlede glassrør

Resultatet fra forsøket med ikke-silikonbehandlede glassrør viste at det var liten grad av sammenheng i hemningen av CYP3A4 med økende konsentrasjon CsA, til tross for at det i hver prøve var tilsatt 1 % DMSO (Figur 15A). Til forskjell fra dette ble det observert klar reduksjon i enzymaktiviteten ved økende CsA-konsentrasjon i de silikonbehandlede glassrørene (Figur 15B). Det ble på bakgrunn av dette besluttet å utføre videre forsøk med silikonbehandlede glassrør.



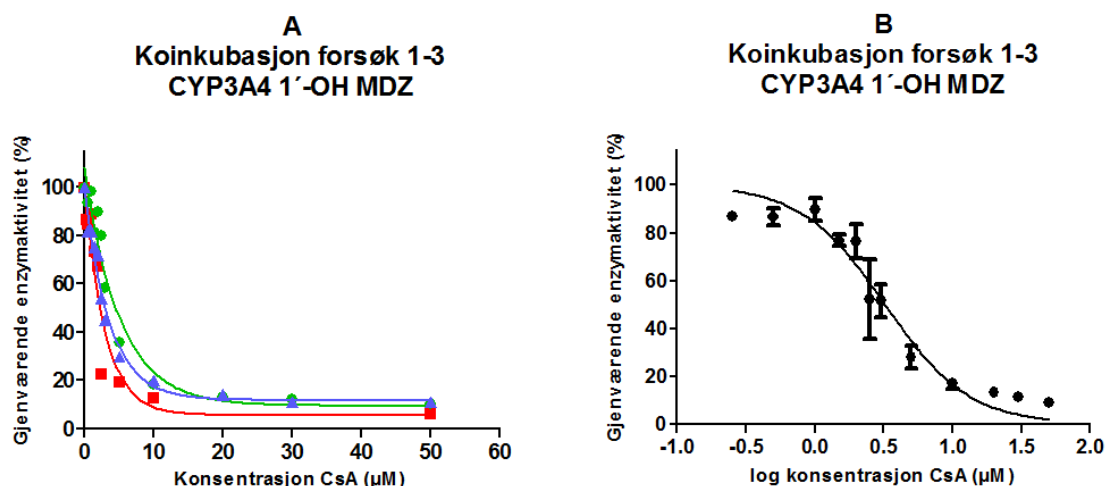
*Figur 15: Sammenlikning av hemmekurver ved 1'-hydroksylering av MDZ. A: Forsøk med ikke-silikonbehandlede glassrør og 1 % DMSO. B: Forsøk med silikonbehandlede rør og 1 % DMSO. Data beskrevet ved Hill-likningen.*

## 3.2 Forsøk med cyclosporin A som hemmer

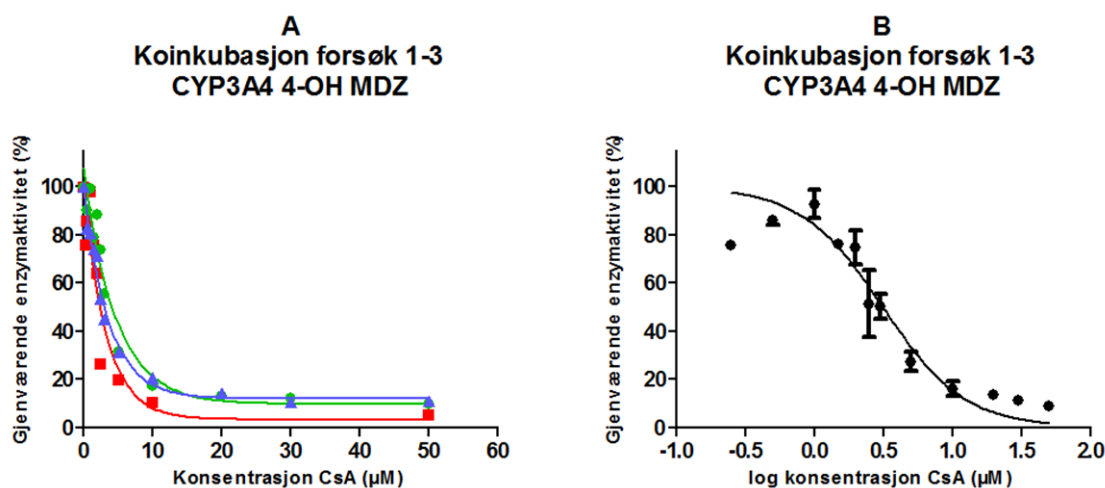
### 3.2.1 Koinkubasjonsforsøk

#### CYP3A4

Koinkubasjon av fast konsentrasjon substrat (2  $\mu\text{M}$  MDZ) og økende konsentrasjon hemmer (CsA) med insektmikrosomer som uttrykte CYP3A4, gav tydelig redusert enzymaktivitet, som vist i Figur 16 og 17. CsA hemmet CYP3A4 gjennom redusert dannelsen av 1'-OH MDZ ved tre individuelle forsøk (Figur 16). Enzymaktiviteten ble redusert ved økende konsentrasjon CsA, og  $\text{IC}_{50}$ -verdiene for forsøkene 1-3 var henholdsvis 2,2  $\mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi= 0,90), 4,3  $\mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi= 0,96), og 3,1  $\mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi= 0,96) (Figur 16A). Gjennomsnittet av forsøk 1-3 gav  $\text{IC}_{50}$ -verdi lik  $3,2 \mu\text{M} \pm 1,1 \mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi = 0,88) (Figur 16B).



**Figur 16: Hemning av 1'-hydroksylering av MDZ via CYP3A4, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved koinkubering.** A: Hemmekurve for tre individuelle forsøk; forsøk 1; rødt, forsøk 2; grønt, forsøk 3; blått, med  $r^2$ -verdier på henholdsvis 0,90, 0,96, og 0,96. B: Hemmekurve for gjennomsnitt av de tre forsøkene i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier med  $r^2$ -verdi = 0,88. Data beskrevet ved Hill-likningen.



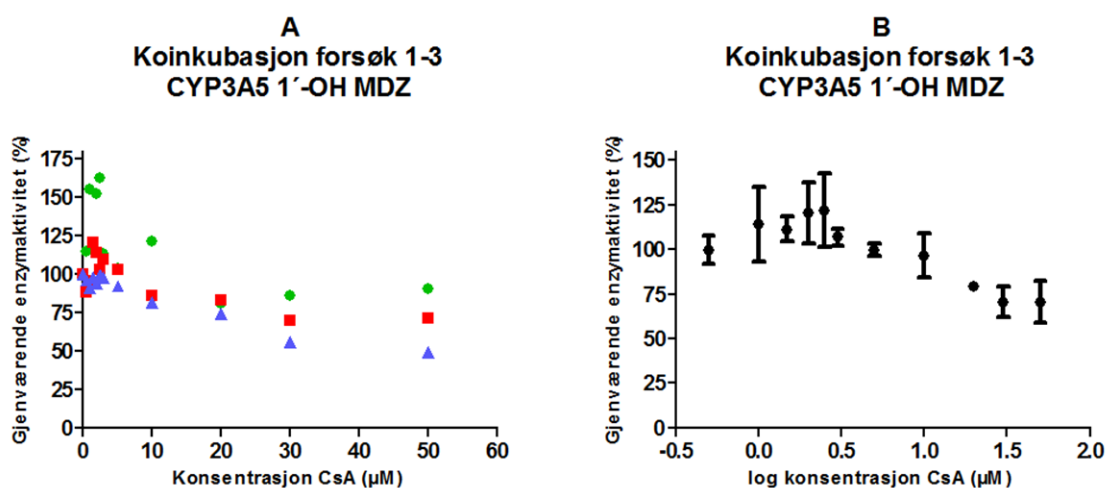
**Figur 17: Hemning av 4-hydroksylering av MDZ via CYP3A4, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved koinkubering.** A: Hemmekurve for tre individuelle forsøk, forsøk 1; rødt, forsøk 2; grønt, forsøk 3; blått, med  $r^2$ -verdier på henholdsvis 0,87, 0,95, 0,97. B: Hemmekurve for gjennomsnitt av de tre forsøkene i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier med  $r^2$ -verdi = 0,88. Data beskrevet ved Hill-likningen.

Hemningen av CYP3A4 gjennom redusert dannelse av metabolitten 4-OH MDZ med økende konsentrasjon CsA, ved tre individuelle forsøk, gav  $IC_{50}$ -verdier på

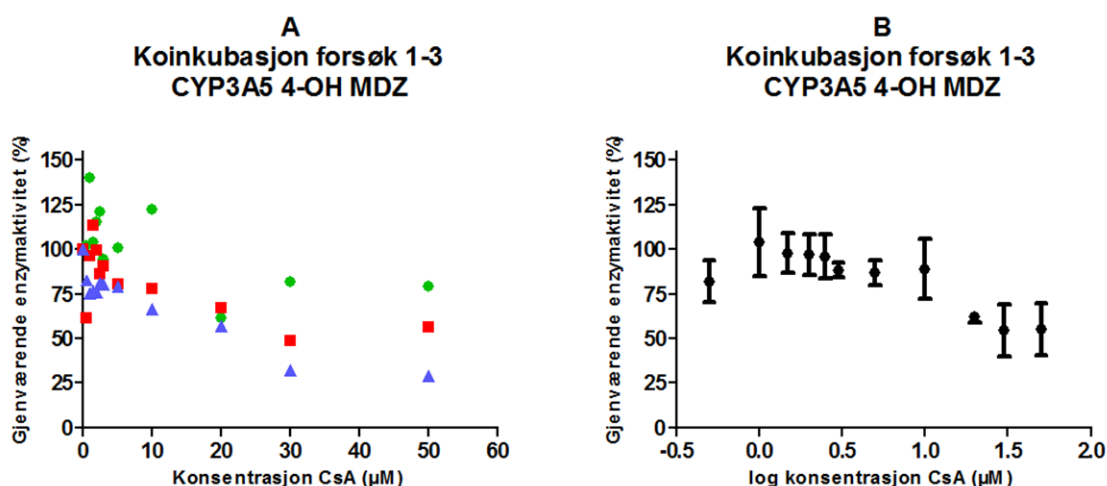
henholdsvis 2,2  $\mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi= 0,87), 3,9  $\mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi= 0,95), og 3,1  $\mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi= 0,97) (Figur 17A). Figur 17B viser hemmekurven ved gjennomsnittet av de samme tre forsøkene som i Figur 17A, der  $\text{IC}_{50}$ -verdien ble estimert til å være  $3,1 \mu\text{M} \pm 0,9 \mu\text{M}$  ( $r^2$ -verdi= 0,88).

## CYP3A5

Ved koinkubasjonsforsøkene ble aktiviteten til CYP3A5 i liten grad hemmet (Figur 18 og 19). Ved lave konsentrasjoner CsA ble dannelsen av 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ ikke hemmet. Det kunne imidlertid observeres en svak hemning i dannelsen av 1'-OH MDZ ved CsA-konsentrasjoner over 10  $\mu\text{M}$ .



**Figur 18:** Hemning av 1'-hydroksylering av MDZ via CYP3A5, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved koinkubering. **A:** Hemmekurve for tre individuelle forsøk, forsøk 1; rødt, forsøk 2; grønt, forsøk 3; blått. **B:** Hemmekurve for gjennomsnittet av de tre forsøkene i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier. Data beskrevet ved Hill-likningen.



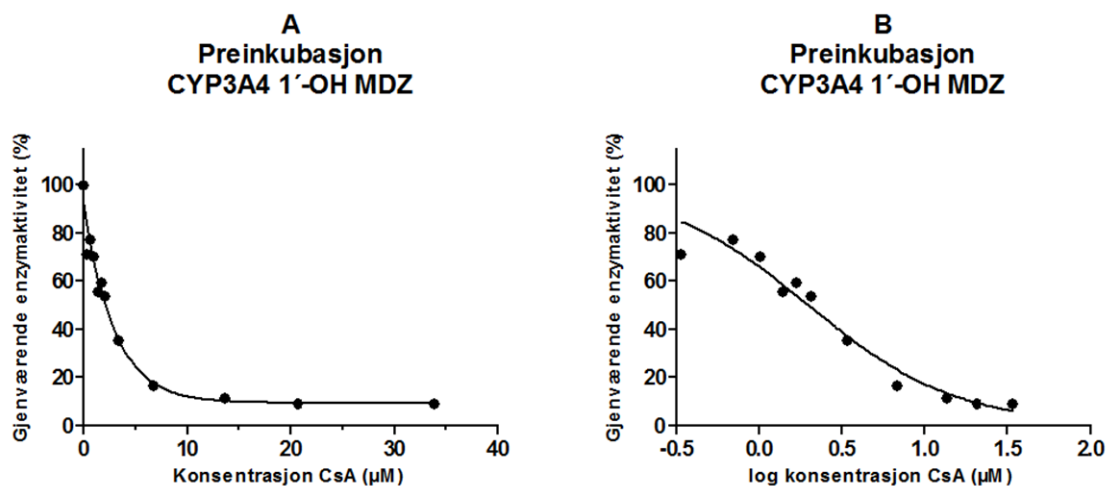
**Figur 19: Hemning av 4-hydroksylering av MDZ via CYP3A5, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved koinkubering.** **A:** Hemmekurve for tre individuelle forsøk, forsøk 1; rødt, forsøk 2; grønt, forsøk 3; blått. **B:** Hemmekurve for gjennomsnittet av de tre forsøkene i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier. Data beskrevet ved Hill-likningen.

### 3.2.2 Preinkubasjonsforsøk

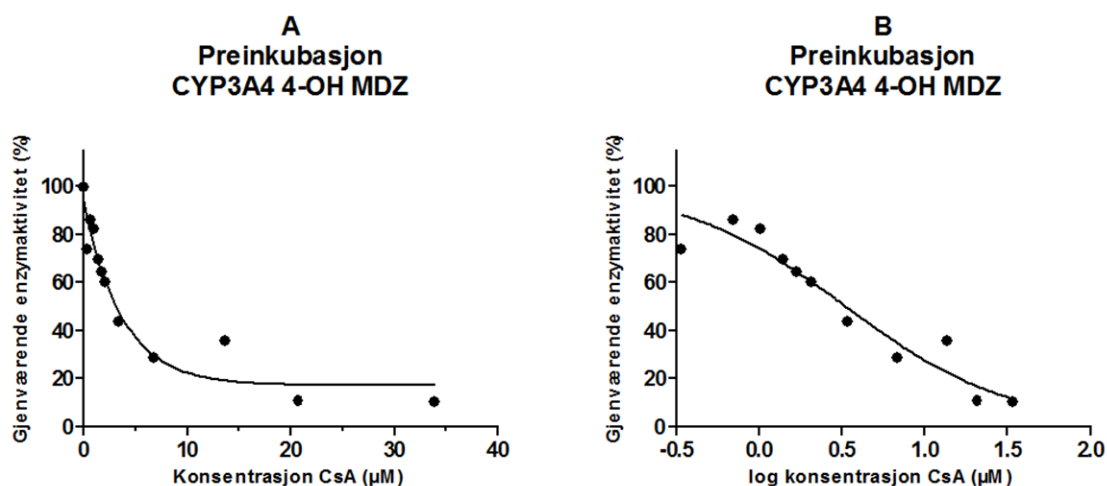
Det ble kun analysert ett forsøk ved preinkubering av CsA med CYP3A4 og CsA med CYP3A5, som følge av tekniske problemer med LC-MS.

#### CYP3A4

Ved preinkubering av insektsmikrosomer, som uttrykte CYP3A4, med CsA i økende konsentrasjon og påfølgende inkubering med fast konsentrasjon MDZ (2  $\mu$ M), viste resultatene en reduksjon av CYP3A4-aktiviteten (Figur 20 og 21). Det ble observert reduksjon i CYP3A4-aktivitet gjennom hemmet omdanning av MDZ til 1'-OH MDZ, ved økende konsentrasjon CsA (Figur 20). Den estimerte  $IC_{50}$ -verdien var 2,0  $\mu$ M ( $r^2$ -verdi= 0,95). Ved omdanning av MDZ til 4-OH MDZ ble det også observert redusert enzymaktivitet ved økende CsA-konsentrasjoner (Figur 21).  $IC_{50}$ -verdien ble beregnet å være 3,3  $\mu$ M, med  $r^2$ -verdi lik 0,92.



**Figur 20: Hemning av 1'-hydroksylering av MDZ via CYP3A4, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved preinkubering. A: Hemmekurve for ett enkelt forsøk. B: Hemmekurve av forsøket i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier med  $r^2$ -verdi = 0,95. Data beskrevet ved Hill-likningen.**

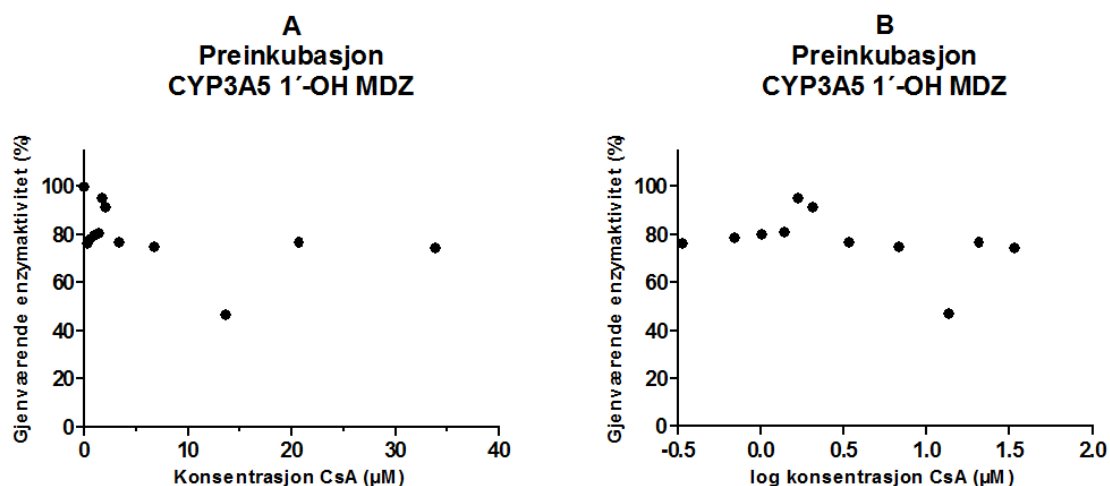


**Figur 21: Hemning av 4-hydroksylering av MDZ via CYP3A4, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved preinkubering. A: Hemmekurve for ett enkelt forsøk. B: Hemmekurve av forsøket i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier med  $r^2$ -verdi lik 0,92. Data beskrevet ved Hill-likningen.**

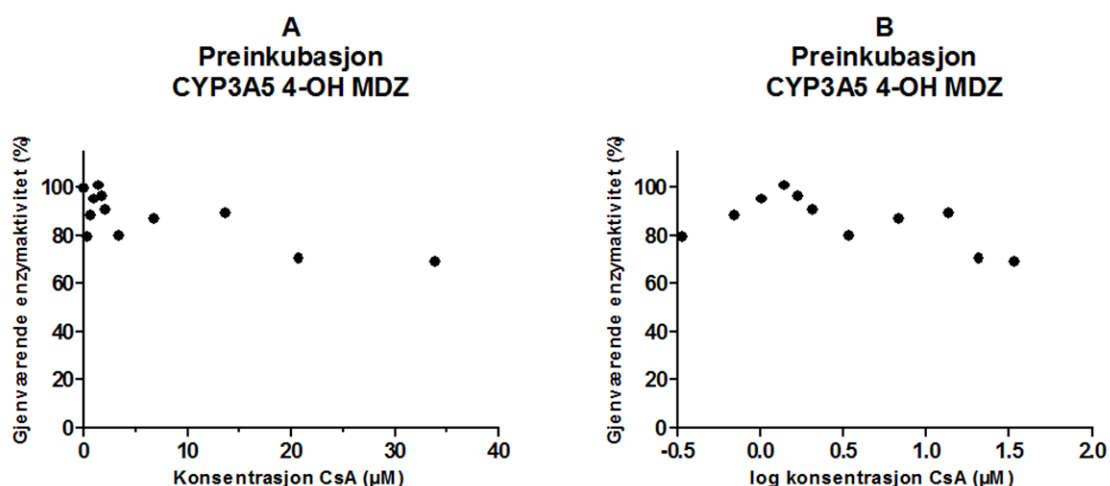


## CYP3A5

I likhet med koinkubasjonsforsøkene, ble det også ved preinkuberingen observert lite hemning av CYP3A5 med CsA (Figur 22 og 23). Omdannelsen av MDZ til 1'-OH MDZ (Figur 22) og 4-OH MDZ (Figur 23) ved CYP3A5 ble i liten eller ingen grad hemmet av CsA.



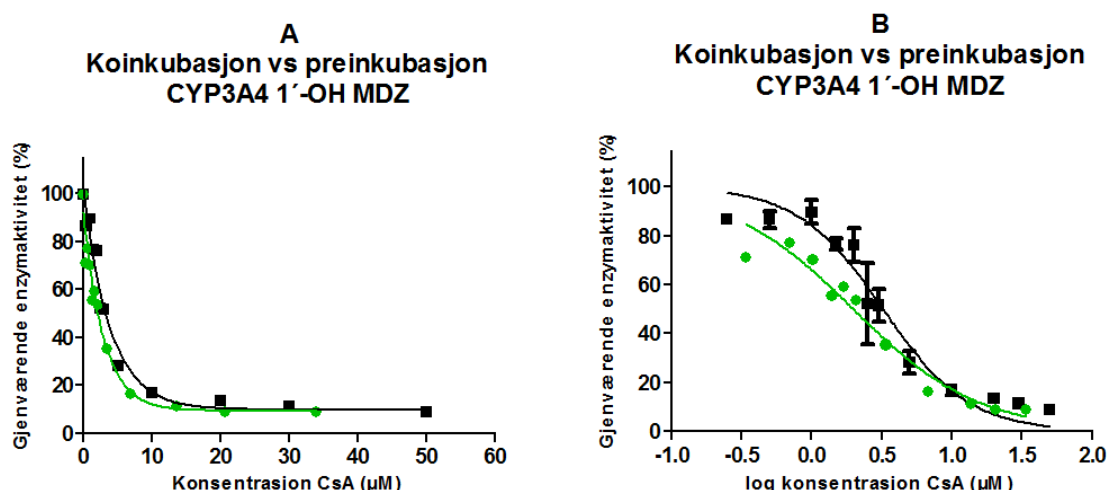
**Figur 23: Hemning av 1'-hydroksylering av MDZ via CYP3A5, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved preinkubering. A: Hemmekurve for ett enkelt forsøk. B: Hemmekurve av forsøket i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier. Data beskrevet ved Hill-likningen.**



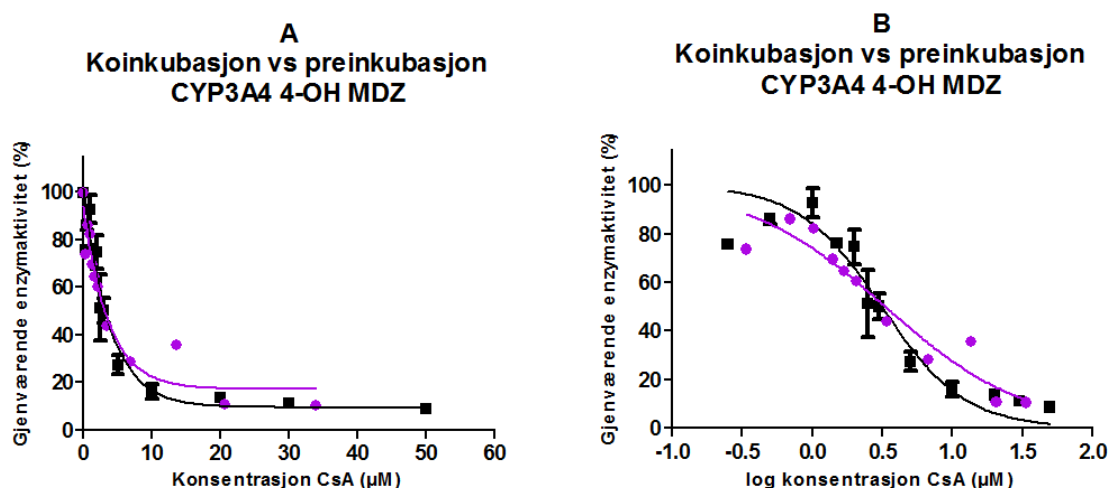
**Figur 22: Hemning av 4-hydroksylering av MDZ via CYP3A5, som funksjon av CsA-konsentrasjon, ved preinkubering. A: Hemmekurve for ett enkelt forsøk. B: Hemmekurve av forsøket i A, med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier. Data beskrevet ved Hill-likningen.**

### 3.2.3 Koinkubasjonsforsøk versus preinkubasjonsforsøk

Både ved koinkubasjonsforsøkene og preinkubasjonsforsøkene med CsA ble det observert hemning av CYP3A4 (Figur 16, 17, 20 og 21), men ikke CYP3A5 (Figur 18, 19, 22 og 23). Ved sammenlikning av koinkubasjonsforsøkene og preinkubasjonsforsøkene og deres respektive  $IC_{50}$ -verdier, kan man vurdere om hemningen som observeres ved preinkubering skyldes mekanismebasert hemning. Denne type hemning vil gi sterkere inhibering av enzymaktiviteten desto lenger hemmeren er i kontakt med enzymet ved fravær av substrat, og forårsaker dermed en forskyvning i grafen mot venstre. Mikrosomene ble inkubert i 15 minutter ved pre- og koinkubasjonsforsøkene, henholdsvis med og uten hemmer, før substrat ble tilsatt. Dette ble gjort for lettest å finne avvik mellom hemningen ved ko- og preinkubering og deres  $IC_{50}$ -verdier.



**Figur 25: CsA-hemning av 1'-hydroksylering av MDZ via CYP3A4, koinkubasjon vs. preinkubasjon.** **A:** Hemmekurven viser den respektive hemningen av CYP3A4 ved koinkubasjon; gjennomsnitt av tre forsøk (svart) og preinkubasjon; enkelt forsøk (grønn), med  $r^2$ -verdier på henholdsvis 0,88 og 0,95. **B:** Hemmekurven viser hemningen av koinkubasjon (svart) og preinkubasjon (grønn), som i A, men med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier. Data beskrevet ved Hill-likningen.



**Figur 24: CsA-hemning av 4-hydroksylering av MDZ via CYP3A4, koinkubasjon vs. preinkubasjon.** **A:** Hemmekurven viser den respektive hemningen av CYP3A4 ved koinkubasjon; gjennomsnitt av tre forsøk (svart) og preinkubasjon; enkelt forsøk (lilla), med  $r^2$ -verdier på henholdsvis 0,88 og 0,92. **B:** Hemmekurven viser hemningen av koinkubasjon (svart) og preinkubasjon (lilla), som i A, men med logaritmisk transformerte konsentrasjonsverdier. Data beskrevet ved Hill-likningen.

For dannelse av 1'-OH MDZ lå hemmekurven ved preinkubasjon svakt forskjøvet mot venstre i forhold til koinkubasjon (Figur 24A), noe som også ses ved sammenlikning av  $IC_{50}$ -verdiene, henholdsvis 2,0  $\mu M$ , og  $3,2 \mu M \pm 1,1 \mu M$ .

Metabolismen av MDZ til 4-OH MDZ via CYP3A4 gav ingen observert forskyvning av grafen etter preinkubasjon i forhold til koinkubasjon (Figur 25).  $IC_{50}$ -verdiene for koinkubasjon og preinkubasjon var henholdsvis  $3,1 \mu M \pm 0,9 \mu M$  og  $3,3 \mu M$ .

På bakgrunn av at  $IC_{50}$ -verdiene ved 4-OH MDZ etter både ko- og preinkubasjon ikke var endret, og at det kun ble observert svak forskyvning i grafen ved 1'-OH MDZ, tyder resultatene på at CsA ikke er en mekanismebasert hemmer av MDZ-metabolisme via CYP3A4.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Løselighetsforsøk

I litteraturen er CsA beskrevet å ha dårlig løselighet i vann [48, 80], i tillegg til å utvise atypisk løselighetsprofil da det er observert redusert løselighet ved økende temperatur [81]. Ettersom det i denne oppgaven skulle benyttes relativt høye konsentrasjoner av CsA, særlig i mellomrørene ved koinkubasjon, ble det utført løselighetsforsøk for å teste effekten av 1 % DMSO på hemningskorrelasjon og  $IC_{50}$ -verdi i forhold til prøver uten DMSO. Resultatene viste at hemmekurven etter forsøket med tilsatt DMSO gav noe bedre korrelasjon enn forsøket uten DMSO (Figur 13 og 14).  $IC_{50}$ -verdien ved forsøket med tilsatt DMSO ble imidlertid ikke redusert i forhold til forsøket uten DMSO. Det ble i tillegg beregnet prosentvis hemning av kontrollprøven med DMSO i forhold til kontrollprøven uten DMSO, for å vurdere en eventuell effekt av DMSO på CYP3A4-aktiviteten. Da det ble funnet at 1 % DMSO gav over 30 % hemning av dannelsen av 1'-OH MDZ og over 50 % hemning av dannelsen av 4-OH MDZ, ble det besluttet ikke å bruke 1 % DMSO i videre forsøk, ettersom høy grad av hemning som følge av DMSO alene kunne påvirke CsA-hemningen i prøvene. Da DMSO i tillegg ikke førte til reduserte  $IC_{50}$ -verdier ble det vedtatt å utføre fremtidige forsøk *uten* DMSO.

Flere artikler og kasusrapporter har beskrevet feilaktig resultat av plasmakonsentrasjonsmåling av CsA etter blodtaking fra silikonbehandlede sentrale venekatetre (CVK) av plast, der disse også var brukt under administrering av intravenøs dose CsA [82-85]. Det har vært spekulert i om dette skyldes adsorpsjon av CsA til overflaten av CVK som følge av CsAs lipofile egenskaper [84, 85]. På bakgrunn av disse artiklene ble CsAs hemning av CYP3A4 testet i glassrør og sammenliknet med et tidligere forsøk der det var benyttet silikonbehandlede glassrør. Da resultatene viste at de ikke-silikonbehandlede glassrørene gav dårligere korrelasjon i hemningen av CYP3A4 i forhold til tidligere forsøk (Figur 15), ble det besluttet å utføre videre forsøk i silikonbehandlede glassrør.

## 4.2 Forsøk med cyclosporin A som hemmer

### 4.2.1 CYP3A4

Ved hemmeforsøkene, der CsAs effekt på CYP3A4 ble testet, ble det observert hemning ved både 1'- og 4-hydroksylering av MDZ, med en gjennomsnittlig  $IC_{50}$ -verdi på ca 3  $\mu$ M. Likeledes fant Kenworthy *et al.* (1999) at 30  $\mu$ M CsA hemmet 1'-hydroksylering av 5  $\mu$ M MDZ via CYP3A4 med 75 %, i mikrosomer fra humane  $\beta$ -lymfoblastoide cellerlinjer [86]. Tilsvarende resultater, presentert av Stresser *et al.* (2000), viste at 10  $\mu$ M CsA gav 88 % hemning av 1'-hydroksylering av 3  $\mu$ M MDZ via CYP3A4, i insektmikrosomer [87]. Disse resultatene korrelerer godt med resultatene i denne oppgaven, der det ved koinkubasjon ble observert i gjennomsnitt 83 % og 87 % hemning ved dannelsen av 1'-OH MDZ, ved henholdsvis 10  $\mu$ M og 30  $\mu$ M CsA.

Preinkubasjon av CsA og mikrosomer ble gjort for å studere om den CsA-medierte hemningen av CYP3A4 var tidsavhengig. Sammenlikning av resultatene ved 1'-hydroksylering av MDZ viste at kurven etter preinkubering lå svakt forskjøvet mot venstre i forhold til kurven ved koinkubering (Figur 24). Dette kunne også ses ved sammenlikning av  $IC_{50}$ -verdiene, der det etter preinkubasjon ble estimert en verdi som var i underkant av 40 % lavere enn etter koinkubasjon. En slik forskyvning i grafen og reduksjon i  $IC_{50}$ -verdi etter preinkubering kunne indikere at hemmerens effekt er mekanismebasert. Teorien om at CsA er en mekanismebasert hemmer av CYP3A4-katalysert metabolisme av MDZ svekkes imidlertid da  $IC_{50}$ -verdien etter preinkubasjon ligger innenfor standardavviket for gjennomsnittet av  $IC_{50}$ -verdiene ved de tre koinkubasjonsforsøkene, noe som også ses ut fra Figur 24B. Videre ble det ikke observert forskjell i de estimerte  $IC_{50}$ -verdiene ved CYP3A4-mediert 4-hydroksylering av MDZ ved ko- og preinkubering (Figur 25). På bakgrunn av disse resultatene er det lite trolig at CsA utøver mekanismebasert hemning av CYP3A4, noe som samsvarer med flere publiserte resultater der effekten av CsA er testet mot andre substrater. Niwa *et al.* (2007) observerte at CsA hemmet CYP3A4-mediert omdannelse av 10  $\mu$ M nifedipin i HLM, og beskrev denne hemningen som

kompetitiv [88]. Gjennom hemmeforsøk med CsA og østradiol i rekombinante mikrosomer fra *Escherichia coli* fant Satoh *et al.* i 2003 at CsA utviste konkurrerende hemning av CYP3A4 [89]. Selv om resultatene fra andre forskningsgrupper støtter opp om de foreløpige resultatene i denne oppgaven, kan man likevel ikke utelukke CsA som en mekanismebasert hemmer av CYP3A4 da det på grunn av tekniske problemer kun ble analysert ett preinkuberingsforsøk.

CYP3A4-katalysert metabolisme av MDZ ble hemmet av CsA, og enzymaktiviteten var halvert ved ca 3  $\mu\text{M}$  CsA. For at denne interaksjonen skal være av klinisk betydning må CsA utøve en betydelig hemning av enzymet ved klinisk relevante konsentrasjoner, det vil si konsentrasjoner som foreligger ubundet i blod. Som nevnt tidligere er CsA utsatt for førstepassasjemetabolisme i tillegg til å utøve høy grad av binding til både lipoproteiner og blodlegemer [60, 62], og som følge av dette er både biotilgjengeligheten og den frie fraksjonen lav.  $\text{IC}_{50}$ -verdiene som ble beregnet på bakgrunn av forsøkene i denne oppgaven er vesentlig høyere enn realistiske konsentrasjoner av CsA i plasma, der maksimal ubundet CsA-konsentrasjon i portåre er estimert å være ca 0,05  $\mu\text{M}$  [Rune Amundsen, personlig meddelelse]. Det er på bakgrunn av dette lite sannsynlig at CsAs hemning av CYP3A4 er av klinisk betydning i lever, og vil trolig derfor være av mindre betydning ved interaksjonen som observeres mellom CsA og atorvastatin. Man skal allikevel ikke utelukke muligheten for at hemning av CYP3A4 ved CsA er av klinisk betydning i enterocytene, da konsentrasjonen av CsA vil være høyere lokalt i tarm etter oralt inntak, enn den systemiske konsentrasjonen som ellers vil finnes i for eksempel hepatocytene.

Det er i tillegg sett at CsA utøver forskjellig grad av hemning ved bruk av ulike substrater. CsA ble i 1999 vist å hemme CYP3A4-mediert omdannelse av 20  $\mu\text{M}$  østradiol, med  $\text{IC}_{50}$ -verdi på 0,064  $\mu\text{M}$  [90], mens det i 2005 ble funnet  $\text{IC}_{50}$ -verdi på 0,2  $\mu\text{M}$  da CsA hemmet dannelse av M1-metabolitt fra 2  $\mu\text{M}$  repaglinid [54]. Picard *et al.* (2006) observerte hemning av CYP3A4 ved metabolisme av 0,11  $\mu\text{M}$  sirolimus, og estimerte  $\text{IC}_{50}$ -verdien for CsA til å være  $1,08 \pm 0,15 \mu\text{M}$  [91]. Både Kenworthy *et al.* og Stresser *et al.* gjorde forsøk der CsA-hemningen av CYP3A4 ble vurdert

gjennom metabolisme av MDZ, nifedipin og testosteron [86, 87]. Kenworthy *et al.* fant at 30  $\mu\text{M}$  CsA gav 75 % hemning av 5  $\mu\text{M}$  MDZ, 82 % hemning av 25  $\mu\text{M}$  nifedipin og 90 % hemning av 50  $\mu\text{M}$  testosteron, til forskjell fra Stresser *et al.* som fant at 10  $\mu\text{M}$  CsA gav 88 %, 53 % og 35 % hemning av henholdsvis 3  $\mu\text{M}$  MDZ, 10  $\mu\text{M}$  nifedipin, og 50  $\mu\text{M}$  testosteron [86, 87]. I tillegg viste Beulz-Riché *et al.* at CYP3A4-metabolisme av 1  $\mu\text{M}$  methoxymorpholinodoxorubicin ble hemmet med 62 % ved 1  $\mu\text{M}$  CsA [92]. I alle disse studiene er CsA vist å hemme CYP3A4s katalyserende effekt på metabolisme av ulike substrater. Graden av hemning varierer imidlertid stort avhengig av hvilket substrat som benyttes, og ses tydelig gjennom de relativt ulike  $\text{IC}_{50}$ -verdiene og prosentvis hemning som presenteres i de nevnte studiene. Dette kan tyde på at hemning av CYP3A4 ved CsA likevel kan ha en klinisk betydning på tross av at det i denne oppgaven ble observert relativt høye  $\text{IC}_{50}$ -verdier med MDZ som modellsubstrat. Bruk av andre anerkjente probesubstrater for CYP3A4, som nifedipin og testosteron, vil i hemmeforsøk kunne gi en pekepinn på graden av hemning av enzymet. Ved videre studier av en observert interaksjon mellom to legemidler burde imidlertid begge legemidlene benyttes for mest nøyaktig å kunne bestemme den kliniske relevansen. For videre utredning av den kliniske betydningen av CYP3A4-hemning ved CsA, burde atorvastatin bli benyttet som CYP3A4-substrat da disse to legemidlene gir den observerte interaksjonen i visse transplanterte pasienter [66, 67].

#### 4.2.2 CYP3A5

Til tross for klar hemning av CYP3A4, hemmet ikke CsA CYP3A5 i noen nevneverdig grad, verken ved koinkubasjon eller preinkubasjon. Dette samsvarer med funn fra andre studier der sterke hemmere av CYP3A4 har vist i mindre grad å hemme CYP3A5 [93, 94]. McConn *et al.* viste i 2004 at de estimerte  $\text{IC}_{50}$ -verdiene etter hemning av CYP3A5 med erytromycin, nikardipin og ketoconazol, var betydelig lavere enn ved hemning av CYP3A4 med de samme hemmerne [93]. Aktiviteten til CYP3A5 har blitt vist ikke å bli påvirket av verapamil, i motsetning til CYP3A4, der det ble observert hemning [94]. Funnene i denne oppgaven samt resultatene fra de nevnte studiene viser at den katalytiske aktiviteten til CYP3A5 er mindre utsatt for



hemning enn CYP3A4. Det er derfor trolig at pasienter som uttrykker funksjonelt CYP3A5 i mindre grad vil være utsatt for CYP3A4-relaterte legemiddelinteraksjoner enn personer som uttrykker kun CYP3A4. Følgelig vil CsAs hemmende effekt av CYP3A være av liten betydning ved interaksjonen som observeres mellom CsA og atorvastatin, i personer som uttrykker CYP3A5.

## 5. Konklusjon

CsA hemmet dannelsen av både 1'-OH MDZ og 4-OH MDZ via CYP3A4. Ved 1'-hydroksylering ble det observert noe lavere  $IC_{50}$ -verdi etter preinkubasjonsforsøket i forhold til koinkubasjonsforsøkene. Liten forskjell i  $IC_{50}$ -verdi for CsA etter ko- og preinkubasjonsforsøk indikerer at CsA ikke utøver mekanismebasert hemning av CYP3A4-mediert omdanning av MDZ. Ettersom det kun ble analysert ett preinkuberingsforsøk, bør dette studeres videre for fullstendig avklaring.

Ettersom konsentrasjonen som kreves av CsA for å gi halvert enzymaktivitet er vesentlig høyere enn den estimerte kliniske konsentrasjonen i portåren, er det lite trolig at denne hemningen er av klinisk betydning i lever. Det skal likevel ikke utelukkes at den hemmende effekten av CsA på CYP3A4 vil kunne ha klinisk betydning i enterocytene, da konsentrasjonen av CsA lokalt i tarm etter oralt inntak vil være høyere enn den systemiske konsentrasjonen.

CsA gav ikke nevneverdig hemning av dannelsen av verken 1'-OH MDZ eller 4-OH MDZ via CYP3A5. Dette stemmer godt overens med andre studier som har vist at CYP3A5 hemmes i vesentlig mindre grad enn CYP3A4, ved bruk av velkjente hemmere av CYP3A4.

## Kildeliste

1. Lazo, J.S., et al., *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th ed. 2006, New York: McGraw-Hill. XXIII, 2021 s.
2. Rang, H.P., *Pharmacology*. 2003, Edinburgh: Churchill Livingstone. XII, 797 s.
3. Doull, J., L.J. Casarett, and C.D. Klaassen, *Casarett and Doull's Toxicology : the basic science of poisons*. 6th ed. 2001, New York: McGraw-Hill. XIX, 1236 s.
4. Nelson, D. *The Cytochrome P450 Homepage*. 2009 [cited 2010 21.april]; Available from: <http://drnelson.uthsc.edu/Genome.list.htm>.
5. Patki, K.C., L.L. Von Moltke, and D.J. Greenblatt, *In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5*. *Drug Metab Dispos*, 2003. **31**(7): p. 938-44.
6. Shimada, T., et al., *Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **270**(1): p. 414-23.
7. Paine, M.F., et al., *The human intestinal cytochrome P450 "pie"*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(5): p. 880-6.
8. Westlind, A., et al., *Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **281**(5): p. 1349-55.
9. Koch, I., et al., *Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA*. *Drug Metab Dispos*, 2002. **30**(10): p. 1108-14.
10. Yang, H.Y., et al., *Functional cytochrome P4503A isoforms in human embryonic tissues: expression during organogenesis*. *Mol Pharmacol*, 1994. **46**(5): p. 922-8.
11. Tateishi, T., et al., *A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy*. *Life Sci*, 1997. **61**(26): p. 2567-74.
12. Tateishi, T., et al., *No ethnic difference between Caucasian and Japanese hepatic samples in the expression frequency of CYP3A5 and CYP3A7 proteins*. *Biochem Pharmacol*, 1999. **57**(8): p. 935-9.
13. Sim, S. *Home page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee*. 9.september 2008 [cited 2010 21.april]; Available from: <http://www.cypalleles.ki.se/index.htm>.
14. Westlind-Johnsson, A., et al., *Identification and characterization of CYP3A4\*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity*. *Clin Pharmacol Ther*, 2006. **79**(4): p. 339-49.
15. Westlind-Johnsson, A., et al., *Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism*. *Drug Metab Dispos*, 2003. **31**(6): p. 755-61.

16. Özdemir, V., et al., *Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method*. Pharmacogenetics, 2000. **10**(5): p. 373-88.
17. Lin, J.H. and A.Y. Lu, *Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 535-67.
18. Yee, G.C., et al., *Effect of grapefruit juice on blood cyclosporin concentration*. Lancet, 1995. **345**(8955): p. 955-6.
19. Nelson, D.L., M.M. Cox, and A.L. Lehninger, *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. 2005, New York: Freeman. 1119, [91] s.
20. Johnson, E.F. and C.D. Stout, *Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **338**(1): p. 331-6.
21. Houston, J.B. and A. Galetin, *Modelling atypical CYP3A4 kinetics: principles and pragmatism*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(2): p. 351-60.
22. Ortiz de Montellano, P.R., *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 2005, Boston, MA: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
23. Huang, W., et al., *Evidence of significant contribution from CYP3A5 to hepatic drug metabolism*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1434-45.
24. Williams, J.A., et al., *Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(8): p. 883-91.
25. Wrighton, S.A., et al., *Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P-450III family*. Mol Pharmacol, 1989. **36**(1): p. 97-105.
26. Daly, A.K., *Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms*. Clin Pharmacokinet, 2006. **45**(1): p. 13-31.
27. Kuehl, P., et al., *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 383-91.
28. Hutzler, J.M. and T.S. Tracy, *Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(4): p. 355-62.
29. Tracy, T.S. and M.A. Hummel, *Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments*. Drug Metab Rev, 2004. **36**(2): p. 231-42.
30. Rowland, M. and T.N. Tozer, *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications*. 1995, Baltimore: Williams & Wilkins. xiv, 601 s.
31. Korzekwa, K.R., et al., *Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites*. Biochemistry, 1998. **37**(12): p. 4137-47.
32. Atkins, W.M., *Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 291-310.

33. Monod, J., J. Wyman, and J.P. Changeux, *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*. J Mol Biol, 1965. **12**: p. 88-118.
34. Shou, M., et al., *Sigmoidal kinetic model for two co-operative substrate-binding sites in a cytochrome P450 3A4 active site: an example of the metabolism of diazepam and its derivatives*. Biochem J, 1999. **340 ( Pt 3)**: p. 845-53.
35. Zhou, S.F., et al., *Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring*. Ther Drug Monit, 2007. **29**(6): p. 687-710.
36. Kramer, M.A. and T.S. Tracy, *Studying cytochrome P450 kinetics in drug metabolism*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(5): p. 591-603.
37. Brandon, E.F., et al., *An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **189**(3): p. 233-46.
38. Tingle, M.D. and N.A. Helsby, *Can in vitro drug metabolism studies with human tissue replace in vivo animal studies?* Environmental toxicology and pharmacology, 2006. **21**: p. 184-190.
39. Services, U.S.D.o.H.a.H. *Guidance for Industry: Drug Metabolism/Drug Interaction Studies in the Drug Development Process:Studies In Vitro*. 1997 [cited 2010 28/3]; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm072104.pdf>.
40. Alberts, B., *Molecular biology of the cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science. XXXIV, 1463, [86] s.
41. Ekins, S., et al., *Present and future in vitro approaches for drug metabolism*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2000. **44**(1): p. 313-24.
42. *BD Biosciences Human Cytochrome P450 Enzymes*. 2010 [cited 2010 May 4.]; Available from: [http://www.bdbiosciences.com/nvCategory.jsp?action=SELECT&form=formTree\\_catBean&item=774715](http://www.bdbiosciences.com/nvCategory.jsp?action=SELECT&form=formTree_catBean&item=774715).
43. Roymans, D., et al., *Expression and induction potential of cytochromes P450 in human cryopreserved hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(7): p. 1004-16.
44. Loretz, L.J., et al., *Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes*. Xenobiotica, 1989. **19**(5): p. 489-98.
45. Sidemann, U.G., et al., *A comparative study of precision cut liver slices, hepatocytes, and liver microsomes from the Wistar rat using metronidazole as a model substance*. Xenobiotica, 1996. **26**(7): p. 709-22.
46. *Norsk legemiddelhåndbok*, Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok: Oslo.
47. Actavis. *Preparatomtale Midazolam Actavis*. 2006 [cited 2010 28/3]; Available from: <http://www.actavis.no/NR/rdonlyres/139095BE-0C33->

- 4605-A7DA-  
[85EA16C93879/0/SPCMidazolamActavisinjeksjonsvaeske\\_oppl.pdf](#).
48. *Martindale*, Thomson MICROMEDEX: Greenwood Village, Colo.
  49. Kronbach, T., et al., *Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4*. *Mol Pharmacol*, 1989. **36**(1): p. 89-96.
  50. Bjornsson, T.D., et al., *The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective*. *J Clin Pharmacol*, 2003. **43**(5): p. 443-69.
  51. Thummel, K.E., et al., *Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **271**(1): p. 549-56.
  52. Tsunoda, S.M., et al., *Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole*. *Clin Pharmacol Ther*, 1999. **66**(5): p. 461-71.
  53. Svarstad, H., H.C. Bugge, and S.S. Dhillon, *From Norway to Novartis: cyclosporin from Tolypocladium inflatum in an open access bioprospecting regime*. *Biodiversity and conservation*, 2000. **9**(11): p. 1521-1541.
  54. Kajosaari, L.I., et al., *Cyclosporine markedly raises the plasma concentrations of repaglinide*. *Clin Pharmacol Ther*, 2005. **78**(4): p. 388-99.
  55. O'Neil, M.J. and Merck Research Laboratories, *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals / elektronisk ressurs*. 2008, Whitehouse Station, N.J.: Merck Research Laboratories.
  56. Parham, P., *The immune system*. 2nd ed. 2005, New York: Garland. XV, 431 s.
  57. Kahan, B.D., *Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters*. *Transplantation*, 1985. **40**(5): p. 457-76.
  58. Dunn, C.J., et al., *Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)<sup>1</sup> in organ transplantation*. *Drugs*, 2001. **61**(13): p. 1957-2016.
  59. Drewe, J., C. Beglinger, and T. Kissel, *The absorption site of cyclosporin in the human gastrointestinal tract*. *Br J Clin Pharmacol*, 1992. **33**(1): p. 39-43.
  60. Kronbach, T., V. Fischer, and U.A. Meyer, *Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs*. *Clin Pharmacol Ther*, 1988. **43**(6): p. 630-5.
  61. Kolars, J.C., et al., *First-pass metabolism of cyclosporin by the gut*. *Lancet*, 1991. **338**(8781): p. 1488-90.
  62. Novartis. *Novartis Sandimmun Neoral mikstur preparatomtale*. 2008 [cited 2010 28/3]; Available from:

- [https://www.novartis.no/downloads/pdf/spc/sandimmun\\_neoral\\_mikstur\\_spc.pdf](https://www.novartis.no/downloads/pdf/spc/sandimmun_neoral_mikstur_spc.pdf).
63. Falck, P., et al., *Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine a precedes acute rejection in kidney transplant recipients*. Transplantation, 2008. **85**(2): p. 179-84.
  64. Åsberg, A., *Interactions between cyclosporin and lipid-lowering drugs: implications for organ transplant recipients*. Drugs, 2003. **63**(4): p. 367-78.
  65. Kobashigawa, J.A. and B.L. Kasiske, *Hyperlipidemia in solid organ transplantation*. Transplantation, 1997. **63**(3): p. 331-8.
  66. Åsberg, A., et al., *Bilateral pharmacokinetic interaction between cyclosporine A and atorvastatin in renal transplant recipients*. Am J Transplant, 2001. **1**(4): p. 382-6.
  67. Lemahieu, W.P., et al., *Combined therapy with atorvastatin and calcineurin inhibitors: no interactions with tacrolimus*. Am J Transplant, 2005. **5**(9): p. 2236-43.
  68. Hermann, M., et al., *Substantially elevated levels of atorvastatin and metabolites in cyclosporine-treated renal transplant recipients*. Clin Pharmacol Ther, 2004. **76**(4): p. 388-91.
  69. Maxa, J.L., et al., *Rhabdomyolysis after concomitant use of cyclosporine, simvastatin, gemfibrozil, and itraconazole*. Ann Pharmacother, 2002. **36**(5): p. 820-3.
  70. Maltz, H.C., D.L. Balog, and J.S. Cheigh, *Rhabdomyolysis associated with concomitant use of atorvastatin and cyclosporine*. Ann Pharmacother, 1999. **33**(11): p. 1176-9.
  71. Amundsen, R., et al., *Cyclosporine A, but not tacrolimus, show relevant inhibition of OATP1B1 mediated transport of atorvastatin (innsendt for publisering)*. 2010.
  72. Kalliokoski, A. and M. Niemi, *Impact of OATP transporters on pharmacokinetics*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(3): p. 693-705.
  73. Muck, W., et al., *Increase in cerivastatin systemic exposure after single and multiple dosing in cyclosporine-treated kidney transplant recipients*. Clin Pharmacol Ther, 1999. **65**(3): p. 251-61.
  74. Olbricht, C., et al., *Accumulation of lovastatin, but not pravastatin, in the blood of cyclosporine-treated kidney graft patients after multiple doses*. Clin Pharmacol Ther, 1997. **62**(3): p. 311-21.
  75. Neuvonen, P.J., T. Kantola, and K.T. Kivisto, *Simvastatin but not pravastatin is very susceptible to interaction with the CYP3A4 inhibitor itraconazole*. Clin Pharmacol Ther, 1998. **63**(3): p. 332-41.
  76. Christensen, H., et al., *Different enzyme kinetics of midazolam in recombinant CYP3A4 microsomes from human and insect sources*. Drug Metab Pharmacokinet, 2009. **24**(3): p. 261-8.
  77. Hermann, M., et al., *Evaluation of microsomal incubation conditions on CYP3A4-mediated metabolism of cyclosporine A by a statistical experimental design*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(3): p. 265-71.

78. Postvoll, L.W., *Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro : utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter*. 2006, Oslo: L.W. Postvoll. 50 s.
79. Hestad, A.L., *CYP3A5 mediert metabolisme av midazolam i ulike mikrosompreparater*. 2008, Oslo: A.L. Hestad. 59 s.
80. Reymond, J.P. and H. Sucker, *In vitro model for ciclosporin intestinal absorption in lipid vehicles*. *Pharm Res*, 1988. **5**(10): p. 673-6.
81. Ismailos, G., et al., *Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media*. *J Pharm Pharmacol*, 1991. **43**(4): p. 287-9.
82. Duffner, U., et al., *Spuriously raised cyclosporin concentrations drawn through polyurethane central venous catheter*. *Lancet*, 1998. **352**(9138): p. 1442.
83. Claviez, A., et al., *Elevated blood drug levels obtained from indwelling silicon catheters during oral cyclosporine A administration*. *Bone Marrow Transplant*, 2002. **29**(6): p. 535-6.
84. Lorenz, R.G., et al., *Problems with therapeutic monitoring of cyclosporine using silicone central venous line samples*. *Transplantation*, 1991. **52**(6): p. 1109-10.
85. Busca, A., et al., *Monitoring of cyclosporine blood levels from central venous lines: a misleading assay?* *Ther Drug Monit*, 1994. **16**(1): p. 71-4.
86. Kenworthy, K.E., et al., *CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates*. *Br J Clin Pharmacol*, 1999. **48**(5): p. 716-27.
87. Stresser, D.M., et al., *Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates*. *Drug Metab Dispos*, 2000. **28**(12): p. 1440-8.
88. Niwa, T., et al., *Effect of cyclosporine and tacrolimus on cytochrome p450 activities in human liver microsomes*. *Yakugaku Zasshi*, 2007. **127**(1): p. 209-16.
89. Satoh, T., et al., *Studies on the interactions between drug and estrogen. II. On the inhibitory effect of 29 drugs reported to induce gynecomastia on the oxidation of estradiol at C-2 or C-17*. *Biol Pharm Bull*, 2003. **26**(5): p. 695-700.
90. Satoh, T., et al., *Studies on the interactions between drugs and estrogen: analytical method for prediction system of gynecomastia induced by drugs on the inhibitory metabolism of estradiol using Escherichia coli coexpressing human CYP3A4 with human NADPH-cytochrome P450 reductase*. *Anal Biochem*, 2000. **286**(2): p. 179-86.
91. Picard, N., et al., *Metabolism of sirolimus in the presence or absence of cyclosporine by genotyped human liver microsomes and recombinant cytochromes P450 3A4 and 3A5*. *Drug Metab Dispos*, 2007. **35**(3): p. 350-5.
92. Beulz-Riche, D., et al., *Effects of paclitaxel, cyclophosphamide, ifosfamide, tamoxifen and cyclosporine on the metabolism of methoxymorpholinodoxorubicin in human liver microsomes*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002. **49**(4): p. 274-80.



- 
93. McConn, D.J., 2nd, et al., *Differences in the inhibition of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by metabolite-inhibitor complex-forming drugs*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(10): p. 1083-91.
  94. Wang, Y.H., D.R. Jones, and S.D. Hall, *Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil*. Drug Metab Dispos, 2005. **33**(5): p. 664-71.